

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ  
ANTIOXIDAČNÍ/ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY**

**Analytical methods of evaluation of antioxidant/free-radical scavenging  
activity**

**Diplomová práce**

**Pavčina Baronová**

**Školitel: Ing. Kateřina Macáková**

**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**Hradec Králové 2009**

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce Ing. Kateřině Macákové za vedení a ochotu v průběhu sepisování této diplomové práce, za poskytnutí literárních zdrojů a udělení konzultací při zpracování informací. Děkuji Mgr. Vítu Kolečkářovi za podporu a pomoc při zpracování literárních zdrojů.

Děkuji rovněž svým rodičům, sestře Halině a kamarádce Joanně Sikorové za podporu a zázemí, díky kterému jsem mohla sepsat tuto diplomovou práci.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literatury, kterou uvádím v seznamu použité literatury.

Pavčina Baronová

## PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

AAPH	2,2-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
ABAP	2,2'-azobis-amidinopropan
ABTS <sup>•+</sup>	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) radikál
ATP	adenozin-5'-trifosfát
AUC	plocha pod křivkou (area under curve)
β-PE	β-fykoerytrin
BHT	butylhydroxytoluen
cGMP	cyklický guanozin-3',5'-monofosfát
CL	chemiluminiscence
CNS	centrální nervový systém
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CoQ <sub>10</sub>	koenzym Q10
DMPD	N,N-dimethyl-p-fenylendiamindihydrochlorid
DMPO	2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DPPH	difenylpikrylhydrazyl
EC <sub>50</sub>	"efektivní" koncentrace vzorku způsobující pokles absorbance o 50 %
ECD	elektrochemická detekce
EDRF	endotelový relaxační faktor (endotel derived relaxing factor), oxid dusnatý
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESR	elektronová spinová resonance
FAD	flavinadenindinukleotid

FIA	flow injection analysis, průtoková injekční analýza
FMN	flavinmononukleotid
GMT	$\gamma$ -glutamyltransferáza
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
GST	glutathiontransferáza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HClO	kyselina chlorná
HPLC	kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-ECD	kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
KAT	kataláza
KMBA	$\alpha$ -keto- $\gamma$ -methiolbutyrová kyselina
LDL	low density lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou
LOO <sup>•</sup>	lipidový alkylperoxidový radikál
LPS	lipopolysacharid
MDA	malondialdehyd
MLT	melatonin
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrofotometrie)
NADH	redukováný nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
NOS	syntázy oxidu dusnatého (nitric oxide synthases)
RMCD	methylovaný $\beta$ -cyklodextrin (randomly methylated $\beta$ -cyklodextrin)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SIA	sekvenční injekční analýza
SOD	superoxiddizmutáza
TAA	celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity)
TBA	thiobarbiturová kyselina
TBHQ	terciární butylhydrochinon
TCA	trichloroctová kyselina
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
TPTZ	2,4,6-tripyridyl- <i>s</i> -triazin
UV	ultrafialová část spektra
XOD	xantinoxidáza

## Obsah

1. Úvod a cíl práce	9
2. Volné radikály	11
2.1. ROS reaktivní formy kyslíku	12
2.1.1. Superoxid	13
2.1.2. Peroxid vodíku	13
2.1.3. Kyselina chlorná	14
2.2. RNS reaktivní formy dusíku	14
2.2.1. Oxid dusnatý	14
2.2.2. Peroxynitrit	16
2.3. Zdroje volných radikálů v organismu	17
2.4. Funkce volných radikálů v organismu	19
3. Antioxidanty	21
3.1. Vysokomolekulární endogenní antioxidanty	22
3.2. Nízkomolekulární endogenní antioxidanty	23
3.2.1. Kyselina askorbová (vitamin C, askorbát)	23
3.2.2. Alfa-tokoferol a vitamín E	24
3.2.3. Ubichinon/ubichinol (koenzym Q)	24
3.2.4. Karotenoidy, $\beta$ -karoten a vitamin A	25
3.2.5. Thioly a bisulfidy	25
3.2.6. Kyselina lipoová (lipoát)	26
3.2.7. Melatonin	26
3.2.8. Kyselina močová	26
3.2.9. Bilirubin	26
3.3. Exogenní antioxidanty syntetické	27
3.4. Exogenní antioxidanty přírodní	27
3.4.1 Polyfenoly	27

3.4.1.1. Flavonoidy	28
3.4.1.2. Kondenzované trísloviny (proanthokyanidiny, anthokyaniny)	28
3.4.1.3. Fenolické kyseliny	29
3.4.2. Ginkgo biloba	29
3.4.3. Silymarin	29
4. Antioxidační (antiradikálová) aktivita	30
4.1. Metody založené na eliminaci radikálů	31
4.1.1. Eliminace syntetických radikálů	31
4.1.2. Eliminace kyslíkových radikálů	33
4.1.3. Eliminace lipidové peroxidace	36
4.2. Hodnocení redoxních vlastností látek	38
4.2.1. Metody chemické	38
4.2.2. Metody elektrochemické	39
4.3. Metody využívající HPLC analýzy s on-line detekcí antioxidantů	41
4.4. Průtokové screeningové metody	44
5. Příklady využití antioxidačních metod v praxi	49
6. Závěr	56
7. Seznam použité literatury	59
8. Abstract	64
9. Abstract	65



## 1. Úvod a cíl práce

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species - ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species - RNS) a že tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami - mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agens, schopné organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.<sup>1</sup>

Aerobní způsob života a získání energie nutně vedl k řešení vztahu organismů a volných radikálů. Na jedné straně využívají organismy volné radikály ve svůj prospěch – k ničení fagocytovaných mikroorganismů, při ovulaci a oplodnění vajíčka, volné radikály mají signalizační význam v buňce apod. Na druhé straně mohou volné radikály organismus závažně poškodit. Jsou známy nemoci, v jejichž etiopatogenezi či rozvoji komplikací hrají volné radikály hlavní úlohu. Patří k nim např. diabetes mellitus, zhoubné novotvary, záněty<sup>2</sup> a také kardiovaskulární onemocnění, např. ischemie, hemoragický šok, ateroskleróza, srdeční selhání, akutní hypertenze.<sup>3</sup>

Na druhé straně zde ale existují přírodní a syntetické antioxidanty, které chrání biologické struktury před patogenetickými účinky těchto volných radikálů. Snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Tím omezují proces oxidace v organismu nebo směsích, kde se vyskytují. Z hlediska konzumenta lze hodnotit přítomnost přirozených antioxidantů v potravinách kladně, jednak prodlužují jejich trvanlivost, jednak jejich užívání má příznivé účinky na jeho zdraví, neboť snižuje pravděpodobnost vzniku srdečně-cévních chorob a některých typů rakoviny.<sup>4</sup>

Cíle diplomové práce:

- typizace a funkce volných radikálů a antioxidantů
- uvedení základních metod stanovení antioxidační aktivity a jejich rozdělení podle typu použitých radikálů a způsobu detekce
- využití instrumentace v antioxidační analýze
- uvedení příkladů antioxidačních metod využívaných v praxi
- srovnání výhod a nevýhod jednotlivých antioxidačních metod

## 2. Volné radikály

Jádro atomu složené z kladných protonů a neutrálních neutronů je obklopeno negativními elektrony. Elektrony zaujímají v atomech a molekulách definované prostory, tj. energetické hladiny, zvané orbitaly. Každý orbital může obsahovat maximálně dva elektrony a ty musí mít opačný spin (směr rotace). Pokud atom nebo molekula, ať už neutrální nebo ion, obsahuje alespoň jeden orbital s jediným, nepárovým elektronem, částice se nazývá volný radikál. Většina biomolekul nejsou radikály, neboť obsahují orbitaly plně obsazené dvěma elektrony.

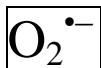
Volný radikál z „normálních“ molekul vzniká trojím způsobem:

a/ Homolytickým štěpením kovalentní (dvoelektronové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron. K homolytickému štěpení je třeba hodně energie, například vysoká teplota, ultrafialové nebo ionizační záření.

b/ Redukcí - přidáním jednoho elektronu.

c/ Oxidací - ztrátou jednoho elektronu.

V biologických systémech volné radikály vznikají energeticky snadnějším způsobem - odejmutím nebo přijetím elektronu. Radikály mohou být neutrální částice nebo záporně či kladně nabité ionty. To záleží na tom, zda počet protonů v atomových jádrech radikálu odpovídá počtu elektronů v orbitalech (neutralita), či nikoli (ion). Vzorce radikálů se označují tečkou, indikující nepárový elektron, a jsou-li popisované částice zároveň ionty, je vzorec doplněn podle počtu a typu náboje symboly plus (+) nebo minus (-).



Obr. č. 1. Superoxidový radikál (je zároveň radikálem a iontem).

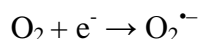
Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. Obecně bývají radikály vysoce reaktivní částice, protože mají tendenci doplnit párový elektron, a tak jsou schopné rychle se navázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule nebo jí ho odejmout. Pokud radikál reaguje s „normální“ molekulou, může ji změnit na radikál a radikálová reakce se tím propaguje do okolí. Teprve reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí a vzniká „normální“ molekula. Radikálová reakce se tak ukončí - terminace.

Volné radikály jsou látky, které se v těle tvoří při látkové přeměně, při obraně před bakteriemi nebo při expozici ultrafialovým nebo ionizačním zářením. Nemoci, stres, kouření atd. přispívají k intenzivnější tvorbě volných radikálů. Některé volné radikály jsou běžnou součástí zdravého metabolismu, některé se objevují nebo se jejich množství zvyšuje v průběhu nemoci, psychické a fyzické zátěže. Také stárnutím se zvyšuje tvorba volných radikálů a zmenšuje schopnost jejich eliminace.

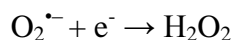
Všeobecně se předpokládá, že pro správnou funkci biologických systémů je nutné udržet rovnováhu mezi tvorbou a zánikem reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS).<sup>1</sup>

## 2.1. ROS reaktivní formy kyslíku

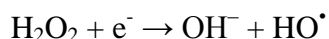
Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému. Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku (biradikál) redukuje na monoradikál superoxid:



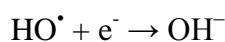
a další elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:



Je-li k dispozici další elektron, molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  se rozpadne na vodu (v rovnici je uvedena disociovaná forma) a hydroxylový radikál  $\text{HO}^\bullet$  (má o jeden el. méně než  $\text{OH}^-$ ):



Poslední elektron redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody:



Popsaná čtyřelektronová redukce molekuly atmosferického (tripletového) kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života. Probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií, v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy, umožňuje transformaci energie chemických vazeb živin do adenosintrifosfátu (ATP), což je univerzální forma energie pro biochemické procesy organismu. Nejaktivnější forma kyslíku ( $\text{HO}^\bullet$ ) není ve vazbě s enzymem škodlivá. Volná částice je však velmi toxickou látkou, neboť ve tkáni se ihned slučuje s téměř jakoukoli sousední molekulou nebo z ní vytrhne elektron a aktivuje ji.<sup>1</sup>

### 2.1.1. Superoxid

Superoxid má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá dismutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku:



Přestože ve vodném prostředí reakce probíhá velkou rychlostí, v organismech je ještě urychlována enzymem superoxiddismutázou.

Superoxid může v organismu vznikat oxidací xantinových derivátů na kyselinu močovou. V tomto případě je také neutralizován enzymem superoxiddismutázou.<sup>5</sup>

### 2.1.2. Peroxid vodíku

$\text{H}_2\text{O}_2$  není radikálem, avšak do skupiny ROS patří, neboť se účastní vzniku radikálů. Reakce samotného  $\text{H}_2\text{O}_2$  s biomolekulami jsou poměrně pomalé, avšak v přítomnosti tranzitních kovů ( $\text{Fe}^{2+}$  nebo  $\text{Cu}^+$ ) se peroxid vodíku pohotově redukuje:

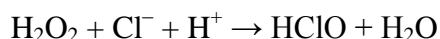


Touto železem katalyzovanou Haberovou-Weissovou reakcí, známou jako Fentonova reakce, vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál  $\text{HO}^\bullet$ , který v živé hmotě ihned reaguje s okolními biomolekulami. Jde o extrémně silné oxidační činidlo, vytrhující elektron z nenasycených mastných kyselin, atakující a hydroxylojící aminokyseliny a báze nukleových kyselin.

Po Fentonově reakci může superoxid redukovat  $\text{Fe}^{3+}$  zpět na  $\text{Fe}^{2+}$ , takže je regenerováno pro další katalýzu. Tranzitní kovy neboli přechodné prvky či kovy (Fe, Cu) se účastní vzniku reaktivních forem kyslíku, jen pokud nejsou vázány v bezpečných depozitních formách, jako je Fe ve feritinu a v transferinu a Cu v ceruloplazminu. Bezpečné uložení a tím „inaktivace“ tranzitních kovů jsou nezbytné k tomu, aby byl čas odstranit superoxid z tkáně zmíněnou superoxiddizmutázou a peroxid vodíku katalázou. Oba enzymy jsou součástí antioxidačního ochranného systému organismu, který zahrnuje též enzym glutathionperoxidázu (odstraňující peroxidy) a řadu neenzymových „lapačů“ volných radikálů (scavengers), například askorbát, tokoferol, urát, bilirubin,  $\beta$ -karoten a jiné látky účastnící se zneškodnění ROS (např. redukovaný glutathion).<sup>1</sup>

### 2.1.3. Kyselina chlorná

Kyselinu chlornou ( $\text{HClO}$ ) syntetizují neutrofilní granulocyty (polymorfonukleáry) pomocí své myeloperoxidázy:



Kyselina chlorná je silný oxidant. Polymorfonukleáry ji používají spolu s dalšími ROS a RNS jako baktericidní prostředek.<sup>1</sup>

## 2.2. RNS reaktivní formy dusíku

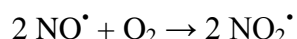
### 2.2.1. Oxid dusnatý

Přestože je oxid dusnatý  $\text{NO}^\bullet$  (nitric oxide) velmi jednoduchá molekula, syntetizuje se v těle poměrně složitým enzymovým mechanismem. Teprve v 80. letech byla objevena a v současnosti je intenzivně studována jeho funkce v buněčné signalizaci. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých okolností prudce jedovatými látkami. Protože součet elektronů dusíku a kyslíku ( $7 + 8 = 15$ ) je lichý a do orbitalů se vejdou dvojice, oxid dusnatý musí být radikál. Přesto  $\text{NO}^\bullet$  při svých koncentracích *in vivo* reaguje velmi pomalu s většinou biomolekul včetně kyslíku, neboť difuze oxidu dusnatého do krve a jeho inaktivace

hemoglobinem je mnohem rychlejší než uvažovaná reakce. *In vivo* reaguje dostatečně rychle jen s tranzitními kovy a radikály. Metabolity NO<sup>•</sup> však jsou velmi reaktivní.

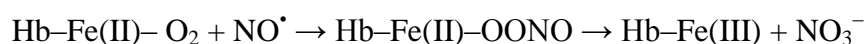
Molekulu NO<sup>•</sup> si získala pověst vysoce reaktivní a toxické molekuly na základě dvou pozorování *in vitro*:

a/ Ve vysoké koncentraci oxid dusnatý rychle reaguje s kyslíkem na oxid dusičitý (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) a posléze na dusitan:

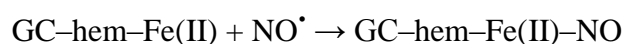


b/ Další zkušenost říká, že NO<sup>•</sup> má krátký poločas v pokusech s perfuzí orgánů. Je pravda, že v nasyceném vodném roztoku, tedy v koncentraci asi 2 mmol/l, má poločas kratší než 1 s. Avšak fyziologické koncentrace NO<sup>•</sup>, dosažené konstitutivními syntézami, se pohybují v nmol/l a poločas oxidu dusnatého v reakci s kyslíkem se prodlužuje s řaděním NO<sup>•</sup> tak, že by se *in vivo* pohyboval kolem 70 hodin. Krátký život NO<sup>•</sup> v perfuzních pufrech je způsobený kontaminací tranzitními kovy, vysokou koncentrací kyslíku a UV zářením. Nízká koncentrace oxidu dusnatého *in vivo* postačuje k jeho regulačním funkcím a přitom neškodí.

Kvůli malé příležitosti k reakci *in vivo* má NO<sup>•</sup> i v nízké fyziologické koncentraci biologický poločas pouze několik sekund. Příčinou však není interakce s biomolekulami, nýbrž skutečnost, že je pohotově a průběžně vychytáván v erytrocytech. Pohotově totiž reaguje se železem oxyhemoglobinu. Vzniká methemoglobin a nitrát a jde o jeden z nejúčinnějších způsobů inaktivace NO<sup>•</sup> a o jednu z podmínek jeho regulační funkce *in vivo*:



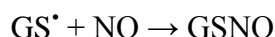
Oxid dusnatý se stejně pohotově navazuje na hemové železo enzymu guanylátcyklázy, což je podstata stimulace syntézy cGMP, vedoucí k relaxaci hladkého svalstva cév (vazodilataci), a mechanismu dalších regulací:



*In vivo* v přítomnosti akceptorů elektronů ( $\text{NO}_2^\bullet$ , tranzitních kovů) se  $\text{NO}^\bullet$  snadno slučuje s fenoly (tyrozinem), thioley (cysteinem, glutathion, albuminem) a se sekundárními aminy:



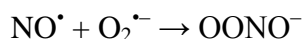
Glutathion (GSH) se snadno metabolizuje na radikál  $\text{GS}^\bullet$  a ten s  $\text{NO}^\bullet$  dává nitrosothiol:



Reakcí se sulfhydrylovými skupinami (-SH) cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek tvoří oxid dusnatý o něco stálější nitrosothioly (thionitry). Tyto látky s biologickým poločasem kolem 40 min jsou zřejmě transportní formou  $\text{NO}^\bullet$ . Mohou totiž předávat nitrosyl  $\text{NO}^\bullet$  jiným molekulám, a tak sloužit jako přenašeče biologicky aktivního  $\text{NO}^\bullet$ .<sup>1</sup>

### 2.2.2. Peroxynitrit

Patologicky nejvýznamnější je reakce  $\text{NO}^\bullet$  se superoxidem, kdy vzniká toxický peroxynitrit:



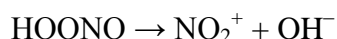
Fyziologické podmínky (pH 7,0) nejsou pro vznik peroxynitritu výhodné vzhledem k nízké koncentraci  $\text{NO}^\bullet$  a zejména superoxidu, avšak při intenzivní syntéze  $\text{NO}^\bullet$  a  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (např. aktivovanými polymorfonukleáry) může koncentrace peroxynitritu dosáhnout významné mikromolární hladiny.  $\text{NO}^\bullet$  je jediná biologická molekula produkovaná v koncentraci postačující ke kompetici o superoxid se superoxiddizmutázou. Peroxynitrit je oxidačním činidlem. Obecně se soudí, že za fyziologického pH se protonovaný peroxynitrit jakožto kyselina peroxydusitá (peroxynitrous acid) rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý:





Peroxynitrit je *in vivo* odpovědný za nitraci a hydroxylaci aminokyseliny tyrozinu.

Tranzitní kovy včetně kovů aktivních center superoxiddizmutázy a myeloperoxidázy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový anion a nitroniový kation, kterému je tradičně připisována schopnost napadnout enolové sloučeniny a *in vivo* v proteinech měnit například tyrozin na 3-nitrotyrozin:



$\text{NO}_2^+$  se rychle slučuje s vodou na kyselinu dusičnou a za fyziologického pH má příliš krátký poločas, než aby mohl efektivně nitrovat biomolekuly. Katalyzátorem nitrace je oxid uhličitý, který rychle reaguje s peroxynitritem za vzniku oxidujících a nitrujících meziproduktů včetně  $\text{NO}_2^\bullet$  a  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ . Kromě toho se tyto radikály ve vodném prostředí snadno přeměňují na dusitan ( $\text{NO}_2^-$ ), dusičnan ( $\text{NO}_3^-$ ),  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>1</sup>

### 2.3. Zdroje volných radikálů v organismu

Za fyziologických podmínek se koncentrace superoxidu ve tkáních pohybuje mezi 0,01 a 0,001 nmol/l, koncentrace peroxidu vodíku mezi 1 a 100 nmol/l a koncentrace  $\text{NO}^\bullet$  se odhaduje v nmol/l. Každý gram lidských jater produkuje 24 nmol superoxidu za minutu.

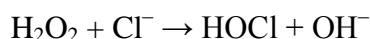
Nejvýkonnějším producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy, zejména ty, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat dioxygen pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu. Jsou to hlavně koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy a enzymy s mědí v aktivním centru.

Nejvydatnějším zdrojem ROS v buňce je respirační řetězec mitochondrií. Primárně se tvoří superoxid a sekundárně peroxid vodíku, který vzniká superoxiddizmutázovou reakcí nebo spontánní dizmutací. Asi 1-4 % kyslíku vstupujícího do dýchacího řetězce je redukováno neúplně, tedy na ROS, nikoli na vodu. Z enzymů respiračního řetězce je hlavním producentem ROS komplex I (NADH-ubichinonreduktáza) a komplex III (ubichinol-cytochrom *c*-reduktáza). Avšak ani čtyřelektronová redukce kyslíku cytochromoxidázou v mitochondriích se neobejde bez náhodného uvolnění reaktivních meziproduktů (superoxidu, peroxidu vodíku) z tohoto enzymu do okolí.

V endoplazmatickém retikulu superoxid vzniká z oxykomplexu cytochromu P-450. ROS vázané na tomto enzymu slouží k významným biotransformačním reakcím endogenních

metabolitů i látek tělu cizích (xenobiotik) a bohužel i k přeměně některých látek na karcinogeny. ROS vznikající na cytochromu P-450 oxidují asi 40 % požitého etanolu. Mohou poškodit i jaterní tkáň.

Ve specializovaných buňkách např. leukocytech a v makrofázích je superoxid produkován NADPH-oxidázou obsaženou v cytoplazmatické membráně jako součást baktericidního ochranného systému. Polymorfonukleáry obsahují též myeloperoxidázu, která produkuje kyselinu chlornou, další oxidační ochranný prostředek:



Navíc jsou tyto buňky schopny indukovat syntézu enzymu tvořícího velké množství  $\text{NO}^\bullet$  a tím i peroxynitritu. Uvedený arzenál tyto buňky používají k zabití bakterií a k destrukci cizích struktur. Malé množství superoxidu se tvoří při náhodné oxidaci hemoglobinu na methemoglobin. V tomto případě molekula  $\text{O}_2$  odebere z  $\text{Fe}^{2+}$  elektron, oxiduje ho na  $\text{Fe}^{3+}$  a kyslík se přitom redukuje na superoxid. Proto je velká část metabolického úsilí erytrocytu zaměřena na ochranu proti oxidaci vlastních struktur.

Oxid dusnatý,  $\text{NO}^\bullet$  (nitric oxide), vzniká v různých buňkách a tkáních z terminálního guanidinového dusíku aminokyseliny argininu v přítomnosti molekulárního kyslíku. K syntéze  $\text{NO}^\bullet$  je třeba čtyř kofaktorů (hemu, FAD, FMN a  $\text{H}_4$ -biopterinu) a dvou kosubstrátů ( $\text{O}_2$  a NADPH). Reakci katalyzují syntázy oxidu dusnatého (nitric oxide synthases - NOS), lišící se v regulaci exprese a v řízení volným  $\text{Ca}^{2+}$ . Klasifikují se též podle primárního zdroje, ze kterého byly izolovány - mozková, makrofágová a endotelová NOS.

NOS I (ncNOS) byla objevena v prasečím mozečku. Později byla nalezena ve specifických neuronech centrálního i periferního nervového systému, ale též v jiných systémech (v myocytech kosterního svalstva, v plicích, neutrofilech, v buňkách macula densa v ledvinách aj.). V buňce se nachází v cytosolu nebo je vázána na proteiny asociované v membráně. Vyskytuje se v neuronech s glutámovými NMDA-receptory. Její aktivita je řízená změnami neuronální aktivity a řadou fyzikálních stimulů (hypoxií, osmotickým tlakem).

NOS II (iNOS) je enzymem makrofágů, chondrocytů, neutrofilů, hepatocytů, buněk cévního hladkého svalstva, buněk Langerhansových ostrůvků. Exprese jejího genu je stimulována cytokiny, mikroby a mikrobními produkty. Každý typ buněk dává přednost jinému faktoru. Makrofágy reagují nejlépe na kombinaci lipopolysacharidu (LPS) a

$\gamma$ -interferonu a LPS. Na uvedené podněty je zahájena intenzivní syntéza  $\text{NO}^\bullet$ , mnohem intenzivnější a trvalejší, než jakou dokážou katalyzovat obě konstitutivní NOS.  $\text{NO}^\bullet$  je tedy důležitým baktericidním a antitumorovým faktorem.

NOS III (ecNOS) je konstitutivní syntáza  $\text{NO}^\bullet$ , která byla nalezena v endotelových buňkách artérií a vén. Její distribuce souvisí s regulací její aktivity. Navazuje se na membrány Golgiho aparátu a na plazmalemové kaveoly. Její exprese je stimulována třecím stresem proudící krve, hypoxií a steroidními hormony, inhibována je cytokiny a LPS. V endotelu byl oxid dusnatý původně popsán jako endothelium-derived relaxing factor (EDRF). V CNS je  $\text{NO}^\bullet$  významným modulátorem syntézy některých neurotransmiterů, je součástí mechanismu účinku excitačních aminokyselinových mediátorů a mechanismu synaptické plasticity.

Radikálové metabolity v organismu poškozují lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Jsou substrátem radikálových reakcí vedoucích k mutagenезi, karcinogenезi a k buněčné smrti. Hrají významnou roli v patogenezi mnoha chorobných stavů.<sup>1</sup>

## **2.4. Funkce volných radikálů v organismu**

Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému. Bez radikálových reakcí by se dnešní formy života nevyvinuly, neboť tak velké množství energie, jaké je třeba jejich výstavbě a funkcím, lze za daných podmínek uvolnit pouze přenosem elektronů ze živin na kyslík (aerobní způsob života).

Do radikálových reakcí vstupuje cytochromoxidáza, která přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík, který se ihned redukuje čtyřmi elektrony na dvě molekuly vody, přičemž se uvolní energie pro syntézu ATP. Podstatné je, že toxické meziprodukty, tj. peroxid vodíku a superoxid, zůstávají navázány na enzym. Tím je zabráněno vzniku reaktivních metabolitů, které by poškozovaly okolní biomolekuly.

Monooxygenázy podobným způsobem aktivují kyslík v endoplazmatickém retikulu jater nebo v mitochondriích nadledviny. Dochází zde k redukci na hydroxylový radikál, který je dále využit k hydroxylaci řady endogenních a exogenních látek včetně léků jako jsou fenylalanin, steroidy, aminy, aromatické uhlovodíky. Tato hydroxylace je důležitá při syntéze cholesterolu a při jeho přeměně na žlučové kyseliny.

Oxidoredukční prostředí se se také podílí přímo nebo nepřímo ovlivněním regulačních molekul na aktivitě enzymů, expresi genů a životních programů buněk, jako např. intenzita metabolických cest, proliferace, diferenciací a nástup apoptózy.

Reaktivní formy kyslíku indukované ve velké míře jsou nástrojem imunitní ochrany, naproti tomu indukce změn nízkých koncentrací ROS jsou regulačním mechanismem.

Neutrofilní leukocyty a makrofágy používají reaktivní formy kyslíku k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Zvláště citliví jsou intracelulární paraziti – *Plasmodia* a *Leishmania*, dále pak některé viry, houby a bakterie a také některé nádorové buňky. Defekt enzymů podílejících se na destrukci pohlcených částic se projevuje jako chronická granulomatóza s častými infekcemi kůže, plic, jater a kostí.<sup>1</sup>

Volným radikálům, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí, např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytózy, se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění.<sup>6</sup>

### 3. Antioxidanty

Antioxidanty se definují jako látky, které při působení v nízkých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit, inhibují nebo zpomalují oxidační destrukci těchto látek.<sup>7</sup> Díky spojování vývoje a vzniku řady lidských nemocí s působením volných radikálů a oxidačním stresem, získaly antioxidanty velkou vědeckou pozornost zejména z důvodu jejich potencionálního léčebného využití.<sup>8</sup>

Bylo zjištěno, že účinnost přirozených antioxidantů přijímaných přirozeně např. v čaji a ovoci, je výrazně vyšší než u stejné dávky podané v čisté podobě jakožto potravinový doplněk (např. vitaminová tableta). Poslední výzkumy ukazují, že minimálně u některých antioxidantů dochází při dlouhodobém užívání v čistém stavu k tzv. zvratu antioxidantu, kdy se jeho antioxidační účinek změní v prooxidační tj. vysoce nežádoucí. Tato vlastnost, jejíž mechanismus je dosud zcela neobjasněn, byla pozorována u  $\beta$ -karotenů (provitamin A), vitaminu E, vitaminu C a flavonoidů. U antioxidantů přijímaných přirozenou cestou žádný zvrát zaznamenán nebyl.<sup>4</sup>

Organismus používá tři možných typů ochrany před oxidačním stresem:

a/ Nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku a dusíku například regulací aktivity enzymů, které je tvoří, nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic.

b/ Druhou možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášecí (quenchers). Tyto pojmy nejsou založeny na chemickém principu, kterým ochranné látky působí, a tak je vymezení jejich obsahu problematické. Mnohem výstižnější je dělení antioxidantů na enzymy a látky dávající s reaktivními formami kyslíku a dusíku stálejší a tudíž méně toxické produkty.

c/ Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul. Fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky a zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA.

Mezi hlavní antioxidační enzymy se řadí superoxiddismutáza, glutathionperoxidázy, glutathiontransferázy a katalasa.

Superoxiddismutasa (SOD) se podílí na odstranění přebytkového superoxidového radikálu, který by mohl být redukován na velmi reaktivní hydroxylový radikál.

Glutathionperoxidázy (GPx) odstraňují intracelulární hydroperoxydy a spolupracují s katalázou při odstraňování peroxidu vodíku např. v erytrocytech.

Glutathiontransferázy (GST) katalyzují konjugaci reakci, při které je sulfhydrylová skupina GSH navázaná na elektrofilní organickou látku. Takto jsou netoxikovány některé látky tělu cizí, tzv. xenobiotika.

Kataláza (KAT) katalyzuje dvouelektrodovou dismutaci peroxidu na dioxygen a vodu. Tímto způsobem inaktivuje peroxid vodíku.<sup>1</sup>

### 3.1. Vysokomolekulární endogenní antioxidanty

Řada proteinů je schopna vázat přechodné prvky (železo, měď) a měnit jejich oxidoredukční vlastnosti tak, že tyto prvky přestanou katalyzovat radikálové reakce. V tomto smyslu se mezi antioxidanty řadí transferin v plazmě a laktoferin polymorfonukleárních leukocytů. Tyto proteiny pevně vážou železo ve formě Fe(III) a tím ho zbavují možnosti vstupovat do Fentonovy reakce.

Dalším proteinem separujícím železo v buňce je feritin, který působí antioxidantně hlavně svou feroxidázovou aktivitou, která skladované železo udržuje v oxidovaném stavu, dokud ho odtud neuvolní silně redukující látka (askorbát).

Prooxidačně nebezpečnou formou železa je hemoglobin uvolněný z erytrocytů a hem uvolněný z hemoproteinů včetně hemoglobinu a myoglobinu. Proto můžeme za antioxidant považovat také haptoglobin, vylučující extracelulární hemoglobin, a hemopexin, vážající uvolněný hem. Významným antioxidantním proteinem plazmy je ceruloplazmin. Tento protein váže měď, která je podstatná pro feroxidázovou aktivitu ceruloplazminu oxidujícího dvojmocné železo na trojmocné. Umožňuje tak uvolnění železa z buněk a jeho předání transferinu. Současně se kyslík oxiduje čtyřmi elektrony na vodu, aniž by vznikaly toxické meziprodukty.

Reaktivitu volných radikálů významně ovlivňují též thiolové skupiny některých proteinů. Albumin váže ion  $\text{Cu}^{2+}$ , který se peroxidem vodíku oxiduje na  $\text{Cu}^{3+}$  a v této formě poškozuje okolní struktury albuminu. Tyto molekuly albuminu se vlastně obětují, neboť jsou odstraněny z oběhu degradními procesy.

Poslední výzkumy upozorňují na reparační úlohu chaperonů. Základní funkce těchto proteinů je navázat na sebe nascentní, ještě nesvinuté proteiny a pomáhat při jejich

posttranslačním prostorovém uspořádání a začlenění do buněčných organel. Oxidační stres indukuje syntézu chaperonů, které zřejmě rozpoznají oxidací poškozené proteiny, vážou je na sebe a urychlí jejich odstranění v proteosomech. Mohou též pomoci při opravách konformace proteinů. A tak je třeba i chaperony považovat za součást systému reparujícího tkáň po oxidačním poškození.<sup>1</sup>

### **3.2. Nízkomolekulární endogenní antioxidanty**

#### **3.2.1. Kyselina askorbová (vitamin C, askorbát)**

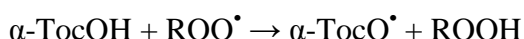
Kyselina askorbová je nutná jako kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. V plazmě se její koncentrace pohybuje mezi 40 a 140  $\mu\text{mol/l}$ . Kromě toho je důležitým redukčním činidlem. Redukuje  $\text{Fe(III)}$  na  $\text{Fe(II)}$  a  $\text{Cu(II)}$  na  $\text{Cu(I)}$ . Umožňuje tak vstřebávání železa ze střeva a využití přechodných prvků v aktivním centru hydroxyláz.

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály, jako  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{HO}_2^{\bullet}$ ,  $\text{HO}^{\bullet}$ , hydrofilní  $\text{RO}_2^{\bullet}$ ,  $\text{NO}_2^{\bullet}$ , a reaguje s  $^1\text{O}_2$  a  $\text{HClO}$ . Všeobecně je přijato, že askorbát regeneruje tokoferolový radikál. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na semihydroaskorbát neboli askorbylový radikál, který je mnohem méně reaktivní než vyjmenované radikály. Regeneruje se speciální dehydrogenázou za účasti NADH (redukovaný nikotinamidadenindinukleotid) zpět na askorbát nebo dizmutuje na askorbát a dehydroaskorbát. Dehydroaskorbátreduktáza za účasti GSH regeneruje dehydroaskorbát na askorbát. Avšak GSH je intracelulární antioxidant, a tak se při oxidačním stresu askorbylové radikály mohou hromadit v extracelulární tekutině a ničit zde biomolekuly.

Také intracelulární ochranné reakce askorbátu se mohou obrátit proti organismu, jestliže železo a měď jsou k dispozici v tzv. „katalytické formě“, tj. když se ve zvýšené míře přesunou z bezpečných vazeb transportních a skladovacích struktur do komplexů s jinými látkami, které jsou oxidoredukčně aktivní. Pak askorbát může redukovat měď a železo na formy katalyzující Fentonovu reakci a stimulovat oxidační poškozené tkáň.<sup>1</sup>

### 3.2.2. Alfa-tokoferol a vitamín E

Vitamin E je skupina osmi isomerů, z nichž biologicky nejúčinnější je  $\alpha$ -tokoferol. Je antioxidační látkou membrán, protože jeho izoprenová struktura je lipofilní. Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály  $\text{LOO}^\bullet$  na hydroperoxydy, se kterými si poradí glutathionperoxidáza GPx. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou atakovat sousední „zdravé“ lipidy. Tokoferol se přitom mění na tokoferylový radikál, který je stabilnější než látky, s nimiž tokoferol reaguje.<sup>1</sup>



Vzniklý tokoferol - radikál může reagovat s vitamínem C, redukovaným glutathionem nebo koenzymem Q. Může také reagovat s dalším volným peroxilovým radikálem, v této reakci ale dochází k nevratné oxidaci tokoferolu a vzniklý produkt je vyloučen žlučí.

Vitamín E chrání buňky před oxidačním stresem a účinky volných radikálů, proto pomáhá zpomalovat stárnutí a prokazatelně působí i jako prevence proti nádorovému bujení. Údajně také zlepšuje hojení ran. Má také pozitivní účinky na tvorbu pohlavních buněk, zvyšuje plodnost a podporuje činnost nervového systému.

Kromě svého antioxidačního působení tokoferol podobně jako cholesterol stabilizuje membránové struktury, ovlivňuje propustnost membrány pro malé molekuly a působí jako inhibitor proteinkinasy C.<sup>9</sup>

### 3.2.3. Ubichinon/ubichinol (koenzym Q)

Ubichinon (koenzym Q, CoQ) je ve skutečnosti skupina benzochinonů, lišících se délkou lipofilního izoprenového řetězce. U savců je nejrozšířenější  $\text{CoQ}_{10}$  s deseti pětiuhlíkovými izoprenovými jednotkami. CoQ je dobře znám jako přenašeč elektronů v dýchacím řetězci v mitochondriích. Vyskytuje se však ve všech membránách, kde tlumí radikálové reakce ve spolupráci s tokoferolem. Zřejmě jako ubichinol pomáhá při regeneraci vitamínu E z tokoferylových radikálů.<sup>1</sup> Nejvíce  $\text{CoQ}_{10}$  obsahuje srdce, plíce, játra, tedy orgány s největšími požadavky na energii.<sup>10</sup>



### 3.2.4. Karotenoidy, $\beta$ -karoten a vitamin A

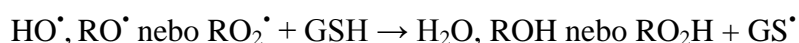
Karotenoidy jsou izoprenové sloučeniny (řadí se mezi terpeny). Karoteny  $\alpha$  a  $\beta$  obsahují dva cyklohexenylové kruhy, karoteny  $\gamma$  a  $\delta$  pouze jeden kruh a lykopen je lineární uhlovodík bez kruhů. V mrkvi zastupuje karotenoidy z 85 %  $\beta$ -karoten a z 15 %  $\alpha$ -karoten. Z některých karotenů vznikají vitaminy A<sub>1</sub>-retinol a A<sub>2</sub>-dehydroretinol. Retinol oxidován na retin hraje významnou úlohu v sítnici v mechanismu vidění.

V antioxidační ochraně se karotenoidy uplatňují při odstraňování radikálů centrovaných na uhlík a alkylperoxylových radikálů (R-O-O<sup>•</sup>) v lipidech. Mechanismus jejich působení je stále nejasný, zdá se, že se uplatňují prostřednictvím tokoferolu. Mohou též zhášet singletový kyslík, tj. měnit tuto excitovanou formu na běžný triplexový kyslík.<sup>1</sup> Betakaroten je prekurzorem vitaminu A. Z jedné molekuly betakarotenu vznikají dvě molekuly vitamínu A. Pokud není tělu dodáván vitamín A, není z čeho tento vitamín vyrábět a to s sebou přináší významná zdravotní rizika. Při předávkování betakarotenem (na rozdíl od vitamínu A) nehrozí žádné vážnější zdravotní problémy.<sup>11</sup>

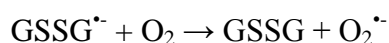
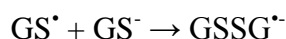
### 3.2.5. Thioly a bisulfidy

Ukázalo se, že do ochrany proti radikálovým reakcím významnou měrou zasahují thioly (redukováný glutathion - GSH), bisulfidy (oxidovaný glutathion - GSSG) a další sirné sloučeniny (lipoamid, taurin, homocystein).

Glutathion (GSH, GSSG) je  $\gamma$ -glutamylcysteinglycin. Tento tripeptid je ve všech savcích buňkách v poměrně vysoké koncentraci (1-10 mmol/l). Převažuje jeho redukováná forma (GSH). Je jedním z nejvýznamnějších redoxních pufrů buňky, neboť se snadno oxiduje a další molekulu glutathionu tvoří glutathiondisulfid (oxidovaný glutathion - GSSG). Jeho posláním je odstraňovat ROS, udržovat v redukované formě sulfhydrylové skupiny proteinů, cysteinu, koenzymu A a regenerovat tokoferol a askorbát. Reaguje neenzymově s různými reaktivními formami kyslíku:



Glutathiolový radikál GS<sup>•</sup> je méně reaktivní než ROS. Může však reagovat s dalším GSH (disociovaným na GS<sup>-</sup>) za vzniku velmi silného radikálu oxidovaného glutathionu (GSSG<sup>•-</sup>), který je schopen redukovat dioxygen na superoxid:



Proto je významná návaznost těchto dějů na aktivitu SOD (superoxiddismutáza). Pokud není přítomen  $\text{O}_2^\bullet$ , glutathionový radikál se dimerizuje za vzniku GSSG a dalšího stabilního produktu (kyseliny glutathionsulfonové nebo glutathionsulfonové).<sup>1</sup>

### 3.2.6. Kyselina lipoová (lipoát)

Kyselina lipoová je kofaktorem pyruvátdehydrogenázového a  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázového komplexu. Je ovšem též univerzálním antioxidantem, protože reaguje s alkylperoxylovými radikály ( $\text{RO}_2^\bullet$ ), askorbylovými radikály,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$ , tokoferyllovými radikály,  $\text{O}_2^\bullet$  a  $\text{HClO}$ . Mechanismus antioxidačního působení není zcela objasněn.<sup>1</sup>

### 3.2.7. Melatonin

Melatonin (MLT) je hormon epifyzy řídící sezonní reprodukční cyklus řady druhů. U člověka zřejmě zasahuje do regulace nástupu puberty a hlavně pak do řízení spánkového cyklu. K poslednímu účelu se používá i terapeuticky. MLT je lipofilní molekula. Při farmakologických hladinách vychytává hydroxylové radikály ( $\text{HO}^\bullet$ ). Po reakci s  $\text{HO}^\bullet$  se mění cestou indolylových radikálů na stabilní N-acetyl-N-formyl-5-metoxykynuramin.<sup>1</sup>

### 3.2.8. Kyselina močová

Kyselina močová je konečným produktem odbourávání purinů a dlouho byla považována za odpadní látku. Zjistilo se však, že je velmi dobrým antioxidantem plasmy. V tubulech se jí 90 % neabsorbuje. Antioxidační schopnosti spočívají ve vychytávání  $\text{RO}^\bullet$  a  $\text{HClO}$  a ve vazbě železa a mědi do formy, která nepodporuje radikálové reakce. Po reakci s  $\text{HO}^\bullet$  a s perferyllovými radikály, což jsou komplexy železa s aktivním kyslíkem, se urát mění v radikály, které mohou biologicky škodit.<sup>1</sup>

### 3.2.9. Bilirubin

Bilirubin je degradační metabolit hemu, který má kromě metabolického významu také antioxidační význam, a to jak volný, tak vázaný na albumin a jiné proteiny. Obě formy

pigmentu inhibují peroxidaci lipidů pravděpodobně tím, že regenerují  $\alpha$ -tokoferol obsažený v lipoproteidech. Bilirubin vázaný na albumin se mění na biliverdin, který je rozpustný ve vodě. Bilirubin tak exportuje radikálovou reakci z LDL do vodné fáze. Bylo prokázáno, že zháší také singletový kyslík.<sup>1</sup>

### 3.3. Exogenní antioxidanty syntetické

Existuje již celá řada syntetických látek, jejichž antioxidační účinky byly otestovány experimentálně i klinicky. Patří k nim stobandin, nitekapon, dimethylsulfoxid (DMSO) a dimethylthiourea (DMTU), ebselen, nitroxidy a další. Tyto látky však u nás zatím nejsou registrovány a ani ve světě nejsou široce užívány.<sup>1</sup>

### 3.4. Exogenní antioxidanty přírodní

K antioxidantům přírodního původu patří hlavně látky fenolického charakteru nazývané často jako polyfenoly. Jsou to sekundární metabolity rostlin s řadou fyziologických funkcí např. ovlivnění růstu a reprodukce rostlin, ochrana rostlin před patogeny a predátory.

Polyfenoly působí proti zánětům, zvýšené srážlivosti krve, mikrobům, aterogenezi, kardioprotektivně nebo vasodilatačně. Mnoho látek rostlinného původu má antioxidační vlastnosti, z nichž nejznámější je účinek flavonoidů, sylimarinu a *Ginkgo biloba*. U taninů (rostlinné polyfenoly, třísloviny) je popisován protinádorový, antihypertenzní, antikonvulzivní a hypocholesterolemický účinek (např. pycnogenol z *Pinus pinaster*). Neexistují zde však větší kontrolované studie.<sup>12-14</sup>

#### 3.4.1 Polyfenoly

Polyfenoly se do popředí úvah o možné antioxidační terapii dostávají teprve v posledních letech. Jsou to látky ubikvitární v rostlinné říši a jsou nejrozšířenějšími sloučeninami s redukčními účinky v naší stravě.

Antioxidační účinek polyfenolů je komplexní a lze jej přičíst několika mechanismům:

1. Řada flavonoidů i dalších polyfenolů inhibuje enzymy zodpovědné za produkci superoxidového anion-radikálu (např. xantinoxidasu, proteinkinasu C). Inhibují i další enzymy, které se podílejí na tvorbě volných radikálů (cyklooxygenasa, lipxygenasa, mikrosomální monooxygenasy ad.)

2. Mnohé polyfenoly vytváří chelátové vazby s kovy, především s mědí a dvojmocným železem. Volné ionty těchto kovů se účastní při tvorbě reaktivních kyslíkových forem např. při Fentonově reakci.

Řada polyfenolů je snadno oxidovatelná. Snadnost oxidace závisí na redoxním potenciálu. Látky s nízkou hodnotou redox potenciálu ( $< 0,75$  V) jsou schopny redukovat některé volné radikály s oxidačními účinky, např. superoxidový, peroxylový, alkoxylový a hydroxylový. Při reakcích poskytují vodík a samy se přitom většinou přeměňují na málo reaktivní fenoxyllový radikál (F1-O $\cdot$ ) nebo neradikálové chinoidní struktury. Význam reakce spočívá v tom, že radikály jsou eliminovány dříve, než reagují s dalšími buněčnými komponentami.

Je však třeba poznamenat, že za určitých okolností mohou některé fenolické látky působit i jako prooxidanty. Za přítomnosti zvýšeného množství přechodných kovů může aroxylový radikál (F1-O $\cdot$ ) reagovat i s kyslíkem za vzniku superoxidu a chinonu.<sup>15</sup>

#### **3.4.1.1. Flavonoidy**

Flavonoidy, jinak nazývané také bioflavonoidy, či vitamíny P, jsou látky náležející mezi rostlinné sekundární metabolity. Jsou známé pro své antioxidační působení. Celkem k flavonoidům patří asi 60 látek, které mají obvykle kladný vliv na lidský organismus, zvláště pak na cévy.

Flavonoidy mohou být významnou součástí antioxidačního systému, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď). Flavonoidy jsou polyfenoly, v jejichž struktuře je základním skeletem 2-fenyl-1,4-benzopyron. Rozdíly mezi flavonoidy jsou dány množstvím a pořadím hydroxylových skupin, rozsahem alkylace a glykosylace. Stupeň hydroxylace je určující pro jejich degradaci ve střevě a typ produktů vytvářených střevní mikroflórou.<sup>16</sup>

#### **3.4.1.2. Kondenzované tříslloviny (proanthokyanidiny, anthokyaniny)**

Anthokyaniny představují důležitou skupinu ve vodě rozpustných pigmentů, poskytujících rostlinným pletivům modrou, fialovou a červenou barvu. Barevné vlastnosti jsou dány mj. spojováním do komplexů s vyšší absorpcí světelných vln a vytvářením komplexů s kovy. Anthokyaniny a proanthokyanidiny vykazují antibakteriální vlastnosti a schopnost inhibovat adhezi bakterií na stěnách močových cest. Anthokyaniny mají také protizánětlivé a antimutagenní účinky a udržují propustnost cév. Schopnost regulovat

propustnost (permeabilitu) kapilár byla základem jejich definice jako vitaminu P. Chrání před hepatitidou A a B a před hepatotoxicitou paracetamolu.<sup>16</sup>

#### **3.4.1.3. Fenolické kyseliny**

Fenolické kyseliny jsou přítomné v řadě potravin. Podle současných poznatků tvoří přibližně jednu třetinu polyfenolů v potravě. V naší stravě jsou fenolické kyseliny zastoupeny především hydroxyskořicovými kyselinami, převážně ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery, dále pak kyselina ferulová.<sup>1</sup>

#### **3.4.2. Ginkgo biloba**

*Ginkgo biloba* - standardizovaný extrakt z jinanu dvoulaločného - preventivně působí u psychických poruch, ve stáří, u periferního vaskulárního poškození, zlepšuje reologické vlastnosti krve a snižuje lipoperoxidaci. U akutní vysokohorské nemoci (5400 m n. m.) snížil vazomotorické poruchy a působil preventivně.<sup>1</sup>

#### **3.4.3. Silymarin**

Silymarin - směs izomerních flavonolignanů (silibinin, izosilibinin, silidianin, silichristin) z ostropestřce mariánského - lapá singletový kyslík, inhibuje lipoperoxidaci, chelatuje kovy, zvyšuje syntézu proteinů v hepatocytech a má imunomodulační účinky. *In vitro* snižuje oxidaci LDL. Působí chemoprotektivně u kožních nádorů. Při podávání silymarinu u alkoholické cirhózy se upravily jaterní testy, hladina bilirubinu a GMT.<sup>1</sup>

#### 4. Antioxidační (antiradikálová) aktivita

V posledních desetiletích vzrůstá snaha o stanovení antioxidační aktivity různých látek rostlinného původu. Děje se tak díky mnoha experimentálním klinickým a epidemiologickým studiím, na jejichž základě se prokázala souvislost mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, nádorových onemocnění, neurologických poruch a v neposlední řadě také procesů stárnutí.

Jeden z přístupů ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží např. k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou také na sebe vzájemně působit. Proto se vědci snaží popsat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku. Je ale nutno si uvědomit, že velké množství látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám. Proto výrazná antioxidační aktivita *in vitro* nemusí znamenat adekvátní účinek *in vivo*. O metabolických procesech v trávicím traktu, biodostupnosti a farmakokinetice přírodních látek nejroznějšího charakteru je dosud známo velmi málo.

Postupy hodnotící míru antioxidační aktivity jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být rozděleny do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále metody posuzující redoxní vlastnosti látek. Stanovení antioxidační aktivity je v podmínkách *in vitro* mnohem jednodušší, rychlejší a méně nákladné než v podmínkách *in vivo*.<sup>5</sup>

#### 4.1. Metody založené na eliminaci radikálů

Tyto metody jsou metodami spočívajícími v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály, které mohou být v reakční směsi vytvářeny nebo jsou do reakční směsi přidávány. Z chemického hlediska jde o radikály kyslíkové nebo syntetické.

##### 4.1.1. Eliminace syntetických radikálů:

*Metoda používající ABTS (metoda TEAC).*

Tato metoda je jednou ze základních nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA (total antioxidant activity). Testuje schopnost vzorku či látek zhaset kation-radikál  $ABTS^{\bullet+}$  (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Je rovněž označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Antioxidační aktivitu se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm.

Při vlastním experimentálním měření se používají dva postupy. V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve kterém byl již vytvořen radikál  $ABTS^{\bullet+}$ , při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při vytváření radikálu  $ABTS^{\bullet+}$ . Častěji se používá postup, při kterém se antioxidant přidává k radikálu  $ABTS^{\bullet+}$  již vyprodukovanému pomocí peroxidasy,<sup>17</sup> vzniklému chemickou reakcí s  $K_2S_2O_8$ <sup>18</sup> nebo elektrochemicky.<sup>19</sup> Stanovení celkové antioxidační aktivity je možné provádět i komerčně vyráběnými sety.<sup>17</sup>

Tato metoda má modifikace:

- TEAC I, která sleduje antioxidační aktivitu hydrofilních vzorků
- TEAC II, která sleduje antioxidační aktivitu lipofilních vzorků
- TEAC III, která sleduje antioxidační aktivitu jak vzorků hydrofilních, tak lipofilních.

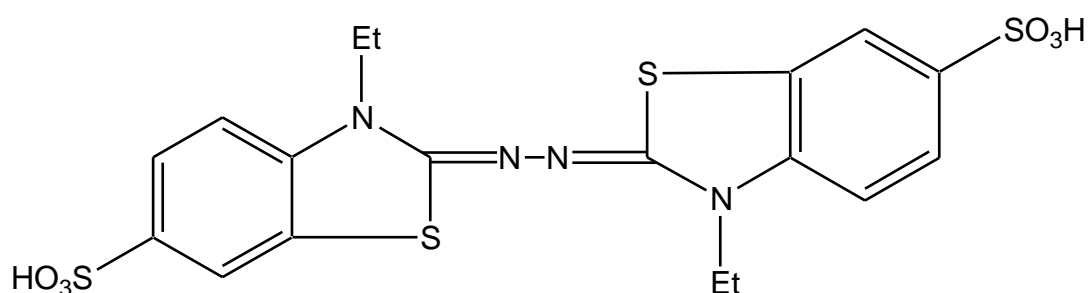
Pro všechny tři modifikace lze použít pro srovnání antiradikálové aktivity Trolox C.<sup>17</sup>

Antioxidační aktivita v %:<sup>20</sup>

$$= \{1 - (\text{Ab}_{734} \text{ vzorku} / \text{Ab}_{734} \text{ slepého vzorku})\} \times 100 \%,$$

kde  $\text{Ab}_{734}$  je absorpance při vlnové délce 734 nm.

Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení, má široké uplatnění v hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu a směsných vzorků.<sup>6</sup>



Obr. č.2. Struktura 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonátu).<sup>21</sup>

#### *Metoda používající DPPH radikál.*

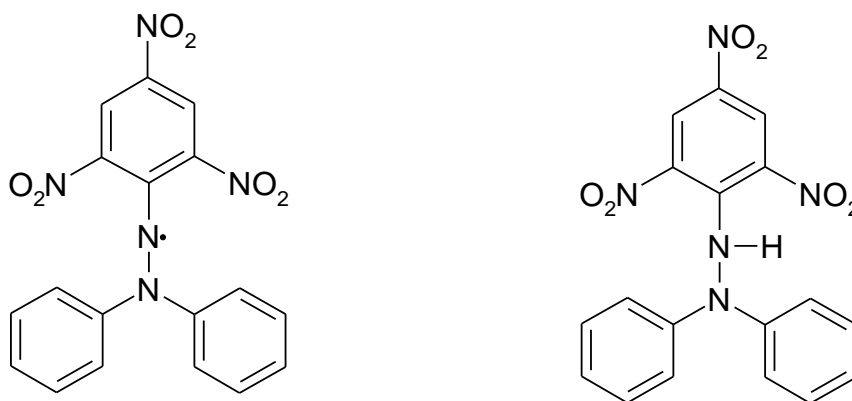
Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem (DPPH). Při reakci dochází k redukci radikálu a jeho odbarvení za vzniku DPPH-H (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazin). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm. U směsných vzorků je antiradikálová aktivita někdy vyjadřována v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Troloxu. Jsou používány aplikace na TLC, vhodné pro screening radikálové zhášecí aktivity směsných vzorků.

Antioxidační aktivita v %:<sup>22</sup>

$$= (1 - \text{absorbance v přítomnosti vzorku} / \text{absorbance v nepřítomnosti vzorku}) \times 100$$



Podobnou modifikací je kombinace testu se separací látek ze směsí metodou HPLC, kdy látky rozdělené na koloně reagují kontinuálně s DPPH a spektrofotometricky se detekuje pík radikálu.<sup>21</sup>



Obr. č.3. Struktura DPPH radikálu a molekuly DPPH.<sup>21</sup>

Stejně jako při testu DPPH se používá metoda redukce stabilního radikálu galvinoxylu (2,6-di-*terc*-butyl-4-[(3,5-di-*terc*-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)methyl]fenoxy). Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm nebo na základě ESR (elektronová spinová resonance).

Pro hodnocení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá také syntetický volný radikál Fredyho sůl (nitrodisulfonan draselný), detekce a hodnocení reakce se provádí pomocí ESR.

#### 4.1.2. Eliminace kyslíkových radikálů:

*Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity).*

Při použití této metody se v testovaném systému vytvářejí kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci.<sup>6</sup> Detekce je založena na sledování úbytku  $\beta$ -fykoerytrinu ( $\beta$ -PE) nebo fluoresceinu (FL) po kontaktu s radikály.<sup>21</sup> Generovány mohou být jak hydroxylové, tak peroxylové radikály.<sup>23</sup> Během metody ORAC se

sleduje plocha pod křivkou (AUC), která je výsledkem závislosti stupně zhášení volných radikálů na čase tohoto zhášení.<sup>24</sup>

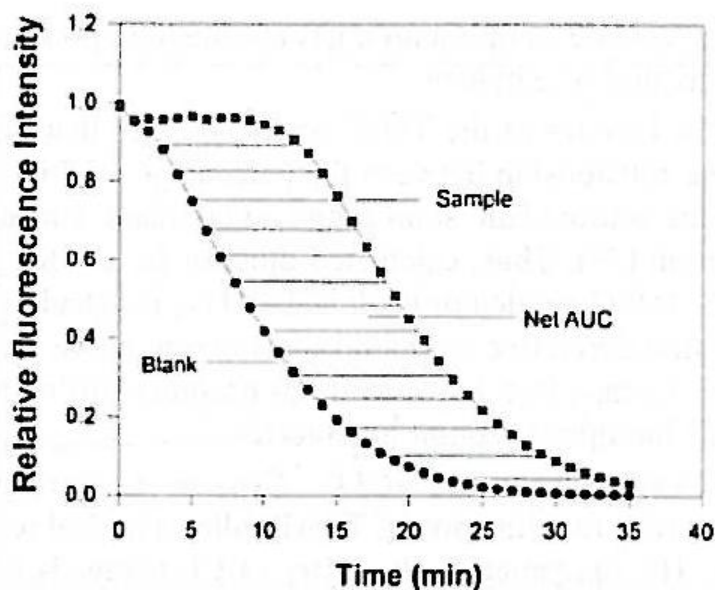
Test ORAC patří k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Originální metoda ORAC, která používá jako sondu  $\beta$ -PE ( $ORAC_{PE}$ ), má široké využití a poskytuje významné informace o antioxidační kapacitě vzorků různého typu. Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností  $\beta$ -PE, např. omezená fotostabilita. Zavedením jiného typu fluorescenční sondy, a sice fluoresceinu, se metodika  $ORAC_{FL}$  zpřesňuje. Uvádí se, že tato metoda je přesnější v důsledku jednoduchého reakčního mechanismu, který spočívá v klasickém přenosu vodíku.<sup>6</sup>

Původní metoda ORAC založena na sledování úbytku fluoresceinu po kontaktu s radikály se zaměřuje pouze na hydrofilní řetězce. Tato metoda je nepoužitelná pro lipofilní antioxidanty, které hrají velmi důležitou roli v oxidaci lipidů. Proto byla tato metoda přizpůsobena lipofilním látkám použitím 50% roztoku acetonu obsahujícího 7 % náhodně methylovaného  $\beta$ -cyklodextrinu (RMCD) pro rozpuštění lipofilních antioxidantů.<sup>21</sup>

Relativní hodnota ORAC:<sup>25</sup>

$$= [(AUC \text{ vzorku} - AUC \text{ slepého vzorku}) / (AUC \text{ troloxu} - AUC \text{ slepého vzorku})] \times (Mr \text{ troloxu} / Mr \text{ vzorku}),$$

kde AUC je plocha pod křivkou, trolox plní funkci kalibračního standardu a Mr je relativní molekulová hmotnost.



Obr. č. 4. Antioxidační aktivita testovacího vzorku znázorněna pomocí plochy pod křivkou (AUC).<sup>21</sup>

#### *Metody založené na vychytávání OH radikálů.*

Při těchto metodách jsou OH radikály vytvářeny různými postupy (Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou syntetických derivátů). Detekce se provádí na základě reakce radikálu s látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající OH radikály snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání OH radikálu salicylovou kyselinou. Vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí metodou HPLC s UV detekcí. Jiným postupem je použití 2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxidu (DMPO) jako lalapče OH radikálu. Adukt DMPO-OH může být kvantifikován pomocí ESR nebo HPLC-ECD (kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí). Další možností je vychytávání OH radikálů deoxyribosou, jejíž degradační produkty jsou stanovovány reakcí s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). Výhodou tohoto postupu je možnost stanovit jak antioxidační, tak prooxidační vlastnosti látek.<sup>6</sup>

#### *Metody založené na eliminaci superoxidového radikálu.*

Tento radikál se generuje neenzymaticky reakcí 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu a NADH (redukovaný nikotinamidadenindinukleotid) nebo systémem xanthin/xanthinoxidasa. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky při

550-560 nm. V testech UV může být nitrotetrazoliová modř nahrazena syntetickým formazanovým barvivem WST-1, které je vzhledem k dobré rozpustnosti vhodnější pro provádění testu na mikrotitračních destičkách. V praxi se používají i další způsoby detekce, např. ESR metoda na základě reakce superoxidového anion-radikálu s DMPO, nebo kombinace HPLC a chemiluminiscence. Měří se inhibice chemiluminiscence luminolu látkami separovanými při HPLC. Jelikož luminol je schopen reagovat s různými reaktivními kyslíkovými radikály, postihuje tato metoda široké spektrum antioxidační aktivity látek.<sup>6</sup>

#### 4.1.3. Eliminace lipidové peroxidace:

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Řada antioxidačních metod se proto zaměřuje přímo na testování inhibičních účinků na lipidovou peroxidaci. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály ( $\text{OH}^\bullet$ ), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxy), a mohou také působit jako látky chelatující ionty přechodných kovů. Navíc je účinek antioxidantu *in vivo* ovlivněn jeho lipofilností. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech, mitochondriích nebo LDL (low density lipoproteins) částicích.<sup>6</sup>

K nejjednodušším testům patří metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. Jako iniciátor radikálové reakce je často užíván AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid). Produkty peroxidace jsou sledovány spektrometricky při vlnové délce 234 nm. Metoda je prováděna v řadě modifikací lišících se přípravou lipidové fáze a způsobem detekce.

Dále se často používá spřažená oxidace  $\beta$ -karotenu a linolové kyseliny vzdušným kyslíkem.  $\beta$ -karoten je díky systému dvojných vazeb ve svém řetězci výborným pohlcovačem radikálů. Antioxidační účinek je hodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm podle spotřeby  $\beta$ -karotenu<sup>26</sup>, přičemž provedení je možné i na mikrotitračních destičkách. Stanovení se také provádí v modifikaci na TLC. Metoda s  $\beta$ -karotenem se užívá pro hodnocení TAA vzorků (total antioxidant activity), je vhodná i pro screening směsných vzorků.<sup>6</sup>

Jednou z nejpoužívanějších metod hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA, která je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). Měří se absorbance při 532 nm. Metoda TBA-MDA je jednoduchá a citlivá. Výhodou je, že test lze realizovat i na mikrotitračních destičkách. Specifičtější vyhodnocením kvantity aduktů TBA-MDA je metoda HPLC.<sup>6</sup>

Reakce TBA za vzniku barevných komplexů však probíhá i s jinými sloučeninami než jen s MDA. Jde především o další produkty oxidativní degradace lipidů (alkenaly, alkendienaly, hydroxyalkenaly), sacharidy a jejich pyrolytické produkty, bílkoviny, rostlinné pigmenty a kationy kovů. Tyto látky nadhodnocují výsledek stanovení a tím snižují specifiku této metody.<sup>27</sup>

Antioxidační aktivita v %:<sup>20</sup>

$$= \{1 - (\text{Ab}_{532} \text{ vzorku} / \text{Ab}_{532} \text{ slepého vzorku})\} \times 100 \%,$$

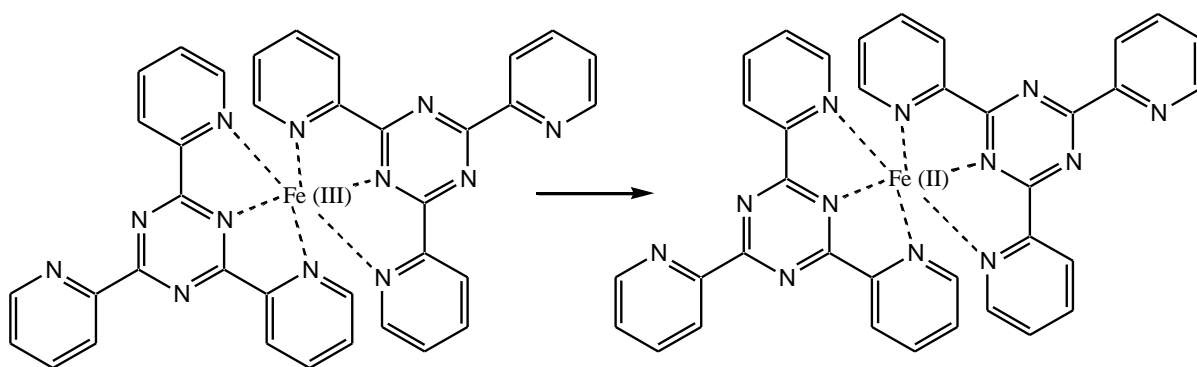
kde  $\text{Ab}_{532}$  je absorbance při vlnové délce 532 nm.

## 4.2 Hodnocení redoxních vlastností látek

### 4.2.1. Metody chemické:

#### *Metoda FRAP.*

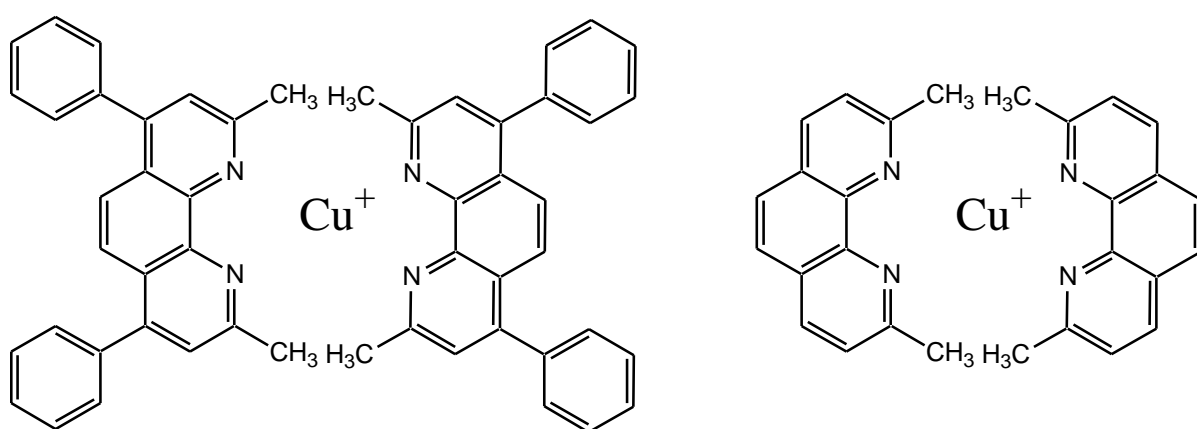
Na principu redoxní reakce je založena metoda FRAP (ferric reducing antioxidant potential), vyvinuta Benzie a Strain.<sup>28-29</sup> Při této metodě dochází k redukci železitého komplexu (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazin) ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) na modře zbarvenou železnatou formu. Jedná se tak o kolometrickou metodu stanovení antioxidantní aktivity. Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ je mírou antioxidantní aktivity vzorku. Tato metoda analyzuje redukční aktivitu biologických materiálů (např. plasmy), antioxidantů v potravinách a vodných roztoků čistých látek. Metoda je jednoduchá a nenáročná, má ale své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6), dále nejsou zachyceny se železitým komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thiole, navíc vznikající železnatý iont je *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce.<sup>6,30</sup> Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat železitý iont a s celkovou antioxidantní aktivitou vzorku nemusí souviset.<sup>6</sup>



Obr. č.5. Redukce kationů  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ .<sup>21</sup>

### Metoda CUPRAC.

Podobnou metodou, založenou na redukci kovu, je metoda redukce mědi (AOP-90 nebo CUPRAC). Podstatou je redukce měďnatého kationtu  $\text{Cu}^{2+}$  na kationt mědný  $\text{Cu}^+$ . Detekce je založena na spektrofotometrickém vyhodnocení komplexu bathocuproinu (2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolinu, AOP-90) při 490 nm nebo neocuproinu (2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolinu, CUPRAC) při 450 nm s  $\text{Cu}^+$ . Měď jako samostatný prvek, ale i jako součást sloučenin, má nižší redoxní potenciál než železo, a proto je tato metoda oproti metodě FRAP více selektivní.



Obr. č. 6. Produkty redukce měďnatých kationtů (2,9-dimethyl-4,7-difenyl-1,10-fenanthrolin, 2,9-dimethyl-1,10-fenanthrolin).<sup>21</sup>

### 4.2.2. Metody elektrochemické:

#### Cyklická voltametrie.

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit cyklickou voltametrií, která sleduje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka – tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického

oxidačního píku  $E_A$  a jeho anodického proudu  $I_A$ . Čím je nižší hodnota  $E_A$ , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku  $I_A$  je možné určit koncentraci látek. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda je látka schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty  $E_A$  korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. s lipoperoxidací, DPPH.<sup>6</sup>

Tato metoda je vhodná pro detekci lipofilních i hydrofilních látek antioxidantů s nízkou molekulovou hmotností. Teoreticky můžeme pomocí cyklické voltametrie detekovat každé redukční činidlo. Limitem pro detekci izolovaných látek je rozpětí 1-10  $\mu\text{M}$ . Tato škála citlivosti je dostačující, a proto také vhodná pro stanovení antioxidační aktivity mnoha biologických látek. Minimální objem tělních tekutin pro použití této metody je 200-300 ml, biologické tkáně 30-500 mg. Získávání vzorku je jednoduché a použití této metody je velmi nenáročné. Tato metoda již byla využita pro zhodnocení stavu redukční kapacity u diabetu, ulcerózní kolitidy, při ozařování, degenerativních mozkových onemocněních, kožních onemocněních a také pro výzkum procesu stárnutí.<sup>31</sup>

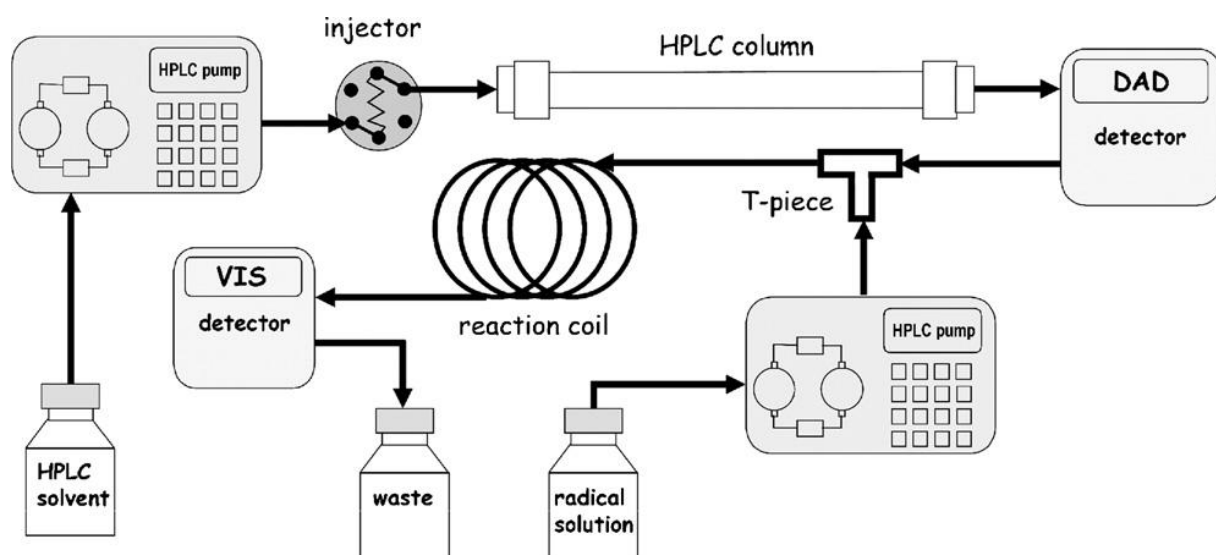


#### 4.3. Metody využívající HPLC analýzy s on-line detekcí antioxidantů.

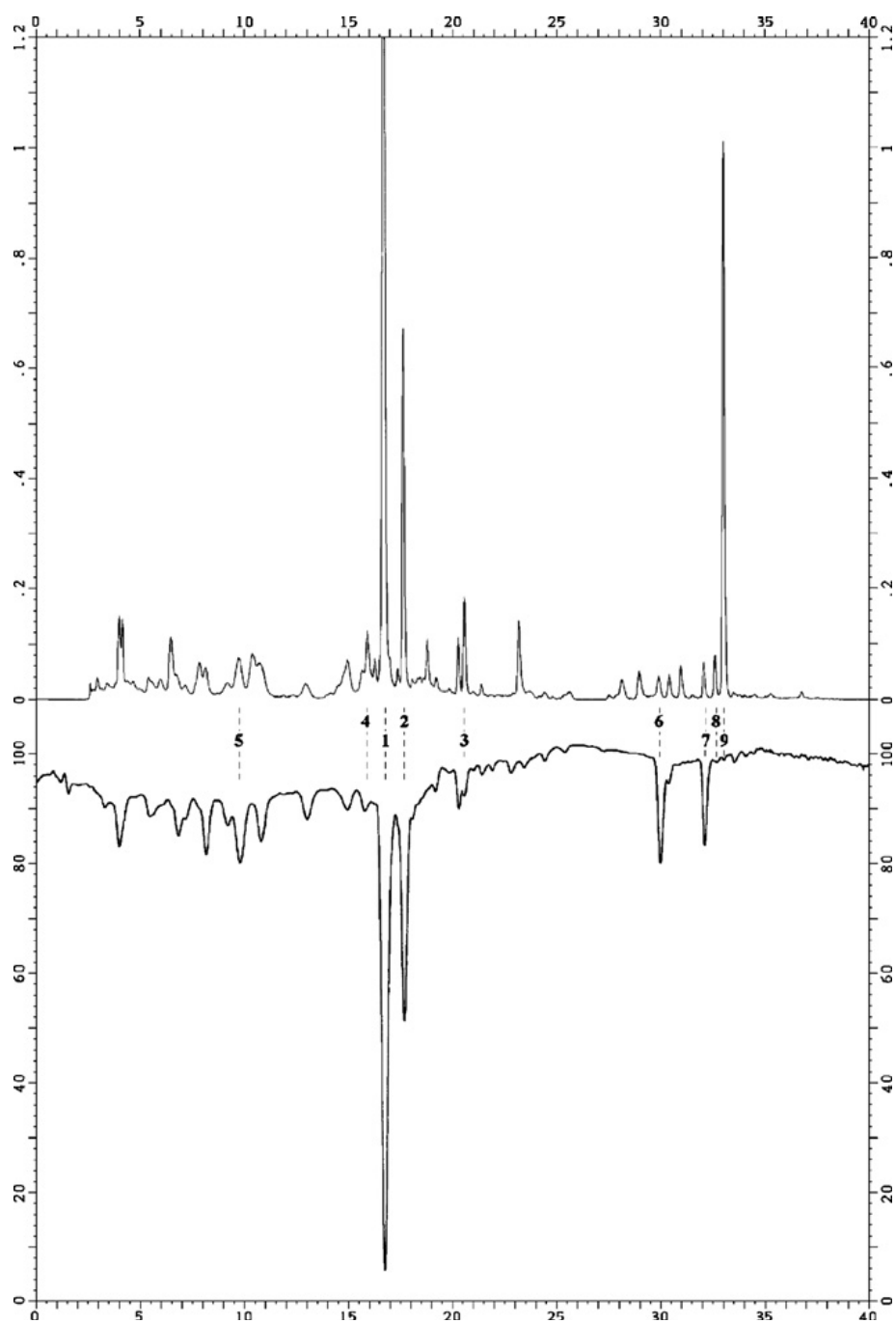
Metody využívající HPLC analýzy s on-line detekcí antioxidantů umožňují rychlé vyhodnocení antioxidační aktivity látek obsažených ve směsích (obr. č. 7.). Metody jsou založeny na elektrochemickém vyhodnocení antioxidační aktivity kdy se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Tato metoda umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační složky na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Dalším způsobem vyhodnocení je detekce na základě chemické reakce látky získané ze směsi po průchodu HPLC kolonou s radikálem v reakční cívce (např. DPPH nebo ABTS radikál). Pokles absorbance roztoku radikálu se vyhodnocuje on-line spektrofotometricky jako negativní pík (obr. č. 8 ).<sup>6</sup>

V současnosti existuje kolem 45 různých variací těchto metod používaných zejména pro rychlé antioxidační analýzy rostlinných antioxidantů, potravin a nápojů. Metody využívající zhášení kyslíkových radikálů jsou výhodné z důvodů aplikovatelnosti při popisu radikálových reakcí v organismech. Problémem je jejich náročná proveditelnost a reprodukovatelnost.<sup>32</sup>

Metody založené na elektrochemické detekci jsou lépe proveditelné, nicméně stále málo využívané v praxi. Nejvíce využívané metody v praxi jsou metody založené na stabilních radikálech jako je DPPH a ABTS radikál (obě metody popsal Koleva et al.<sup>33</sup>). Tyto metody se mohou kombinovat s UV detekcí, MS (hmotnostní spektrofotometrie) nebo NMR (nukleární magnetická resonance) analýzou.<sup>32</sup>



Obr. č. 7. Schéma metody využívající kombinace HPLC a on-line detekce antioxidantů.<sup>32</sup>



Obr. č. 8. Chromatogram zobrazující výsledky HPLC analýzy a poklesy absorbance radikálu.<sup>32</sup>

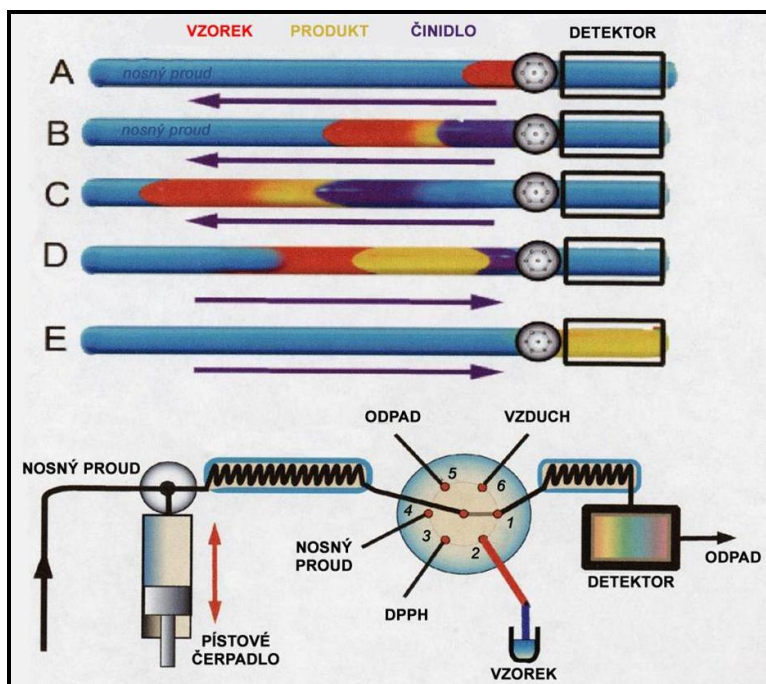
#### 4.4. Průtokové screeningové metody.

U screeningových metod, které se užívají při testování velkých množství různorodých přírodních vzorků, se kladou vysoké požadavky na jednoduchost provedení, krátkou dobu trvání analýzy a současně její vysokou reprodukovatelnost. Pro zkrácení doby analýzy byly vyvinuty tzv. průtokové metody využívající automatizace systému (jedno měření trvá do 10 minut). K dalším výhodám průtokových metod patří použití malého množství měřených vzorků (1 mg), snížení množství použitých rozpouštědel a tím i výsledného odpadu. K nevýhodám lze počítat vyšší finanční náklady na pořízení měřicího systému.<sup>34</sup> Do skupiny průtokových analytických technik patří sekvenční injekční analýza (SIA) a průtoková injekční analýza (FIA).

Metoda FIA funguje na principu dávkování vzorku kohoutem do kontinuálního nosného proudu a mísení s činidlem za vzniku produktu reakce. Toto probíhá při plynulém průtoku jednotlivých zón vícekanálovým systémem směrem k průtokovému detektoru.

Charakteristickým rysem SIA jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jednorázově) aspirovány do jednokanálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla, a poté je pohyb pístu čerpadla obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru (obr. č. 9.). Tím je jeden cyklus ukončen. V tomto případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku podobně jako je tomu u FIA (v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem). Rozdíly se projevují v geometrii nosného proudu. FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku. Mechanické součásti SIA i FIA systému (čerpadlo, selekční ventil) a detektor jsou propojeny prostřednictvím příslušných převodníků a digitálních vstupů a výstupů těchto jednotek s mikroprocesorem, nejlépe počítačem s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data.

Průtokové rychlosti u SIA se prakticky neliší od FIA (1 ml/min) a doba trvání jednoho měřicího cyklu většinou nepřesahuje 30 s. U SIA je možno v jednotlivých cyklech objem vzorku cíleně měnit v rozsahu jednotek až stovek  $\mu\text{l}$  programováním doby otevření příslušného kanálu selekčního ventilu. Takto lze provádět kalibraci, pokud jeden z kanálů selekčního ventilu propojíme s roztokem standardu.



Obr. č. 9. Schéma SIA systému.<sup>35</sup>

SIA má proti FIA nesporné výhody: i když se pracuje s několika roztoky, které je nutno definovaným způsobem vnést do systému, probíhá analýza v jednokanálovém uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Objemy roztoků jsou dány časově, délkou pohybu pístu čerpadla. Při zastaveném toku je možné provádět kinetická měření, např. určovat řád reakcí, stejně jako ve FIA. Tyto postupy vedou k optimalizaci reakčního času, úspoře činidel, eliminaci interferujících signálů pozadí. Protože SIA pracuje s malými diskrétními objemy vzorků a činidel a využívá zastavení a změnu směru toku, spotřeby činidel a vzorků i objem odpadu jsou podstatně nižší než u FIA, kde jsou jednotlivé roztoky čerpány kontinuálně. Velkou výhodou SIA je její flexibilita, daná snadnou změnou parametrů měření prostřednictvím klávesnice počítače, aniž je třeba měnit konfiguraci SIA systému.<sup>36</sup>

Tuto metodu lze využít při testování různých radikálů (DPPH, ABTS, superoxidu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu, peroxyinitritu, oxidu dusnatého).<sup>37</sup>

### *Průtokové metody založené na zhášení ABTS radikálu.*

Obecně pro antioxidační průtokové metody platí, že vzorek, který má být testován, se vloží do nosného proudu roztoku radikálu. Po určité době (čas se pohybuje v rozmezí od 1 do 30 min, v závislosti na naprogramování systému), se koncentrační úbytek radikálu detekuje spektrofotometricky.

Automatizace metody využívající ABTS radikál byla poprvé popsána Pellegrini et al.<sup>38</sup>, který využil jednokanálový systém. Navrhovaný průtokový systém byl využit pro analýzu antioxidační aktivity čistých látek, jako např. kyselina askorbová, kávová, ferulová, gallová a další. Možnost aplikace byla poté vyzkoušena na následujících nápojích: pivo, káva, cola, ovocný džus a čaj. Výsledky se shodovaly s výsledky získanými při analýze nápojů původní ABTS metodou.

Ve studii Bompadre et al.<sup>39</sup> bylo uvedeno, že průtoková metoda popsaná Pellegrinim et al.<sup>38</sup> selhává při screeningu složitějších biologických vzorků. V modifikované metodě byly zavedeny další parametry ovlivňující citlivost a použitelnost metody. Jednalo se o optimální dávkování vzorku (objem vzorku), reakční čas a vliv teploty. Studie uvedla, že optimální teplota pro antioxidační analýzu lidské plasmy byla 35 °C a čas reakce antioxidantů s ABTS 1,3 min.

Zavedením dvoukanálového systému bylo umožněno dávkování reakčního činidla a vzorku tak, aby se snížilo riziko narušení centrální zóny vzorku.

Lima et al.<sup>40</sup> uvedl, že pro optimální průběh analýzy je důležité určité pH prostředí. Bylo zjištěno, že antioxidační aktivita vzorků roste v určitém rozmezí spolu s pH faktorem.

Další modifikací bylo zavedení on-line enzymatické generace ABTS popsané Milardovic et al.<sup>41</sup> Tato metoda je založena na kontinuálním vpravení roztoku ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> přes průtokový bioreaktor obsahující imobilizovanou křenovou peroxidázu, která katalysuje oxidaci ABTS na ABTS radikál, který reaguje s antioxidantem. Pomocí bioamperometrického detektoru byla zjištěna koncentrace reziduálního ABTS. Aby byla minimalizována reaktivita peroxidu vodíku s antioxidantem, autoři snížili koncentraci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ze 120 μM na 30 μM.

### *Průtokové metody založené na zhášení DPPH radikálu.*

Reakční čas u původních DPPH metod (20 min - 6 h) je delší než u ABTS (1-30 min). Detekce byla prováděna spektrofotometricky, pomocí ESR nebo elektrochemicky.

Původní DPPH metoda byla zautomatizována použitím FIA systému využívajícího ESR detekci. Roztok DPPH radikálu byl vpraven do detekční komůrky při konstantním ESR signálu a fixní intenzitě magnetického pole. Během přidání antioxidantu do

nosného proudu (DPPH roztok) došlo k potlačení signálu a zaznamenání negativního píku, jehož výška byla přímo úměrná koncentraci antioxidantů. Metoda byla použita pouze pro čisté látky (kys. askorbová, cystein, trolox).

SIA analýza využívající spektrofotometrické detekce byla několikrát použita jak při antioxidační analýze čistých přírodních látek (kys. askorbová a kávová, katechin, epikatechin a rutin) tak rostlinných a houbových extraktech.<sup>42-44</sup>

#### *Využití průtokových metod při stanovení celkové redukční kapacity*

Průtokové metody lze aplikovat při měření redukční kapacity čistých látek i směsných vzorků (rostlinné extrakty, nápoje, potraviny).

Costin et al.<sup>45</sup> navrhnul použití FIA systému pro určení celkového antioxidačního potenciálu vzorků, za použití chemiluminiscenční detekce. Před detekcí dochází k reakci antioxidantů s manganistanem draselným (pH 2). Tato metoda byla využita pro testování čistých látek (kys. kávová, katechin, epikatechin), bílých i červených vín. Výsledky této metody korelovaly s DPPH metodou.

FIA systém lze využít pro chemiluminiscenční měření antioxidační kapacity olivového oleje. V tomto případě se využívá tříventilový systém. Přítomnost antioxidantu inhibuje chemiluminiscenční signál generovaný směsí luminolu, křenovou peroxidasou, p-iodofenolem a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>46</sup>

Shpigun et al.<sup>47</sup> vyvinul průtokovou potenciometrickou metodu stanovení antioxidační kapacity založené na redukci železitých kationů, využívající platinové elektrody. Metoda je založena na principu FRAP metody. Metoda byla použita pro antioxidační analýzu mnoha různých čistých látek i potravin.

Mannino et al.<sup>48</sup> využil jednokanálový FIA systém využívající elektrochemické detekce. Autoři zjistili, že při nižším elektrodovém potenciálu mohou být oxidovány pouze polyfenoly, které mají 3 nebo 2 fenolické skupiny a to v poloze o- nebo p-. Další modifikace metody umožnila její použití při analýze látek lipofilního charakteru. Testovaný olivový olej byl vpraven do proudu chloroformu obsahující tetrabutylamonium bromid a kyselinu octovou.<sup>49</sup>

Blasco et al.<sup>50</sup> vyvinul screeningový elektrochemický způsob stanovení polyfenolů v potravinách. Jednalo se o jednokanálový systém s amperometrickou detekcí při neutrálním pH. Metoda využívala karbonové elektrody s měnícím se oxidačním potenciálem v závislosti na obsahu polyfenolů. Metoda může být použita např. pro stanovení antioxidační aktivity medu. Buratti et al.<sup>51</sup> použil tuto metodiku pro stanovení antioxidační aktivity čaje.

Pérusse a Leech<sup>52</sup> vyvinuli voltametrický průtokový systém pro stanovení methylenové modři vznikající oxidací benzoyl-leukomethylenovou modři v přítomnosti 13-hydroperoxy-9,11-oktadekadienové kyseliny a myoglobinu. Přidáním vzorku do popsaného média byla tvorba methylenové modři inhibována.



## 5. Příklady využití antioxidačních metod v praxi

Antioxidační metody popsané v předchozích kapitolách se ve vědecké praxi často modifikují. Souhrn všech metodických obměn není z důvodu jejich velkého počtu možný. V této kapitole je pro ilustraci uvedeno několik příkladů praktického využití antioxidačních metod včetně metodického postupu.

### *Antioxidační aktivita jedlé houby *Agrocybe aegerita*.*<sup>20</sup>

Antioxidační aktivita jedlé houby *Agrocybe aegerita* byla stanovena pomocí metody využívající ABTS radikálu, DPPH radikálu a metody hodnotící schopnost inhibovat lipidovou peroxidaci a oxidaci LDL. Nejvíce antioxidačně aktivní byl ethylacetátový extrakt, který vykázal vysokou schopnost eliminovat jak DPPH tak ABTS radikál. Extrakt byl následně rozdělen do čtyř frakcí. Získané frakce prokázaly vysokou antioxidační aktivitu.

#### *Metody použité ve studii:*

ABTS metoda využita ve studii byla modifikovaná metoda popsaná Re et al.<sup>53</sup> Reakční roztok ABTS byl připraven smícháním 5 ml 7mM roztoku ABTS s 88  $\mu$ l 140mM  $K_2S_2O_8$ . Směs byla ponechána 16 hodin v temnu a poté smíchána s 95% ethanolem. Výsledná absorbance reakčního roztoku při vlnové délce 734 nm byla  $0,7 \pm 0,05$ . Pro detekci antioxidační aktivity byl k 1 ml ABTS roztoku přidáno 10  $\mu$ l vzorku. Absorbance byla měřena při 734 nm. Výpočet antioxidační aktivity byl proveden podle vzorce uvedeného v sekci 4.1.1. (str. 32).

DPPH metoda byla s mírnými úpravami použita podle Chu, Chang a Hus.<sup>54</sup> 1 ml 0,1 mM methanolového roztoku DPPH byl smíchán s 0,5 ml vzorku o koncentraci 0,05 až 3 mg/ml. Absorbance reakční směsi byla měřena při 520 nm. Jako antioxidační standard byl použit terciární butylhydrochinon (TBHQ). Antioxidační aktivita byla vypočtena podle vzorce uvedeného na str. 32.(dole).

Inhibice lipidové peroxidace byla studována na homogenátech z krysích mozků podle metody Ng, Liu a Wang.<sup>55</sup> Supernatant z krysích mozků získaný po homogenizaci a centrifugaci byl smíchán s 0,2 ml houbové frakce. Ke směsi bylo přidáno 0,1 ml 10 $\mu$ M  $FeSO_4$  a 0,1 ml 0,1 mM askorbové kyseliny. Směs byla ponechána jednu hodinu při 37 °C. Reakce

byla ukončena přidáním 0,5 ml trichloroctové kyseliny a 0,38 ml thiobarbiturové kyseliny (TBA) a zahřátím na teplotu 100 °C po dobu 20 min. Po centrifugaci byl získán supernatant obsahující reakční produkt obsahující TBA. Absorbance reakčních produktů byla měřena při 532 nm. Jako standard byla použita kyselina kávová.

Inhibice oxidace lidských LDL. LDL byl připraven podle metody Zhang et al.<sup>56</sup> a Lowry et al.<sup>57</sup> Základní roztok LDL byl dialyzován v pufru o pH 7,4, který obsahoval 0,05%  $\text{NaN}_3$ , 0,9% NaCl, 0,1M fosfát sodný a 10 $\mu\text{M}$  EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina).

0,4 ml získaného zředěného LDL byly ponechány s 50 $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , a 50  $\mu\text{l}$  ethylacetátové frakce nebo ultra čisté vody po dobu 4, 12 nebo 36 hodin při 37 °C. Reakce byla ukončena přidáním 25  $\mu\text{l}$  EDTA. Reakční směs byla ochlazená na 4 °C. Reakční produkty byly vytvořeny přidáním 2 ml směsi TCA-TBA-HCl a zahřátím na 95 °C po dobu jedné hodiny. Po ochlazení byly reakční produkty stanoveny spektrofotometricky při 532 nm. Jako antioxidační standard byla použita kyselina kávová.<sup>20</sup>

#### ***Stanovení antioxidační aktivity Brutnáku lékařského (Borago officinalis L.) pomocí on-line metody HPLC-DPPH.***<sup>58</sup>

Antioxidační aktivita Brutnáku lékařského byla stanovena pomocí metody využívající kombinace HPLC metody s on-line DPPH detekcí. Bylo zjištěno, že extrakt z této rostliny vykazuje výraznou antioxidační aktivitu. Jako hlavní antioxidační složka extraktu byla určena kyselina rosmarinová.

#### ***Postup:***

Suché listy Brutnáku lékařského byly extrahovány 80% methanolem. Tento extrakt byl použit pro HPLC analýzu, která využila gradientové eluce (mobilní fáze: 2 až 80% acetonitril s 2% kyselinou octovou). UV detekce extraktu byla provedena při vlnové délce 280 nm. Při on-line detekci antioxidantů byl sledován úbytek absorbance methanolického roztoku DPPH při 515 nm.

#### ***Stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor pomocí metod ABTS, FRAP a DPPH.***<sup>59</sup>

Je známo, že bramborové hlízy s červeně nebo fialově zbarvenou dužninou vykazují významnou antioxidační aktivitu stejně jako jiné druhy barevné zeleniny (např. červené zelí,

nebo červené odrůdy cibule). Cílem této práce bylo zjistit antioxidační aktivitu zbarvených odrůd brambor vypěstovaných v České republice pro šlechtitelské účely a porovnat je se vzorkem standardně používaných konzumních odrůd brambor. Pro dosažení relevantních údajů byly vybrány tři nejběžnější metody pro měření antioxidační aktivity, které se autoři snažili na reálném vzorku mezi sebou porovnat. Ke srovnání byly vybrány metody ABTS, FRAP a DPPH. Výsledky prokázaly vyšší antioxidační aktivitu u červeně a fialově zbarvených odrůd brambor ve srovnání s bramborami žlutomasými. Toto tvrzení je ale ovlivněno výběrem matrice, ve které byla antioxidační aktivita stanovena. Šťáva se ukázala jako nevhodná matrice. Nejlepší lineární korelace byla nalezena mezi metodami ABTS a FRAP při stanovení antioxidační aktivity v matrici lyofilizátu brambor. Lineární korelace mezi DPPH a ABTS, a DPPH a FRAP byly nižší. Výsledky tak potvrdily spíše shodnost ABTS a FRAP metody a naopak jejich rozdílnost oproti DPPH metodě, která může být považována za metodu orientační.

#### *Postup:*

Postup vyhodnocení antioxidační aktivity byl zvolen jednotně tak, aby bylo možno jednotlivé antioxidační metody mezi sebou porovnat. Ve 2 ml roztoku radikálu v kyvetě (10 mm) byla změřena absorbance v čase  $t_0$ . Poté bylo přidáno 5  $\mu$ l vzorku, roztok byl promíchán a ponechán reagovat 20 min a následně byla změřena absorbance v čase  $t_{20}$ .

Antioxidační aktivita byla vypočtena jako úbytek/přírůstek absorbance obecně podle vzorce: antioxidační aktivita (%) =  $100 - [(At_{20}/At_0) \times 100]$  a takto vyjádřená antioxidační aktivita byla převedena podle kalibrační křivky standardu (askorbová kyselina) zhotovené pro danou absorbanci v  $t_0$ . Každý vzorek byl měřen v pěti paralelních stanoveních.

#### *Metoda ABTS*

Při stanovení antioxidační aktivity ABTS testem bylo rozpuštěno 54,9 mg ABTS ve 20 ml fosfátového pufru (pH 7,0; 5 mM) a aktivováno na kationt radikálu  $ABTS^{*+}$  přidáním 1 g  $MnO_2$  za občasného míchání a doby aktivace 30 min. Následně byl roztok centrifugován (5 min, 7000 ot.), zfiltrován přes stříkačkový filtr (PTFE 0,25  $\mu$ m,  $\varnothing$  13 mm, Teknokroma) a naředěn fosfátovým pufrem na absorbanci ( $t_0$ )  $0,500 \pm 0,01$ . Absorbance roztoku byla měřena při vlnové délce 734 nm.

### *Metoda FRAP*

Pracovní roztok FRAP byl připraven smícháním 10 objemových dílů acetátového pufru (300 mM, pH 3,6) s 1 dílem roztoku TPTZ (2,4,6-tripirydyl-*s*-triazin) (10 mM, rozpuštěného ve 40 mM HCl) a s 1 dílem roztoku FeCl<sub>3</sub> (20 mM). Absorbance byla měřena při vlnové délce 593 nm.

### *Metoda DPPH*

Pro měření byla použita metodika Pareja a spol.<sup>60</sup>. Byl připraven methanolický roztok DPPH o absorbanci ( $t_0$ )  $0,200 \pm 0,01$ . Absorbance byla měřena při vlnové délce 515 nm.

### ***Stanovení antioxidační aktivity flavonoidů pomocí metody FRAP.***<sup>61</sup>

Antioxidační aktivita 13 flavonoidů byla testována pomocí FRAP metody. Podle získaných výsledků byly popsány a kvantifikovány vztahy mezi antioxidační aktivitou a chemickou strukturou látek. Pro kvantifikační antioxidační analýzu byly kromě výsledku FRAP testu využity fyzikálně-chemické parametry molekul jako hydratační energie, dipólový moment, sterické parametry (objem a povrch molekuly), suma nábojů na kyslíku a vodíku hydroxylů. Bylo zjištěno, že pro vysoký antioxidační účinek flavonoidů je důležitá přítomnost zejména dvojnás vazby mezi uhlíky 2 a 3 na C-kruhu flavonoidů s OH-skupinou v poloze 3. Antioxidační aktivita rostla také se zvyšujícím se počtem hydroxylů v molekule. Kvantifikační analýza prokázala, že antioxidační účinek nejvíce determinoval parametr suma nábojů na kyslíku hydroxyskupin flavonoidů.

### *Postup antioxidační analýzy:*

Vzorky flavonoidů byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) o koncentracích 100, 250, 500, 750 a 1000  $\mu\text{mol/l}$ . Jako standard byl použit Trolox, který byl připraven ve stejných koncentracích jako testované flavonoidy. Pracovní roztok FRAP byl připraven až těsně před měřením a to smísením 25 ml acetátového pufru, 2,5 ml roztoku TPTZ (tripirydyltriazin) a 2,5 ml roztoku FeCl<sub>3</sub>.

Antioxidační aktivita ve vzorcích byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm. Přímě do kyvety bylo napipetováno 1,35 ml pracovního roztoku FRAP, 135  $\mu\text{l}$  redestilované vody, přístroj byl vynulován a následně bylo přidáno 45  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu. Konečné ředění vzorku bylo 1/34. Absorbance byla odečítána v průběhu 10 min. Kalibrační křivka byla sestrojena s použitím roztoků FeSO<sub>4</sub> namísto vzorku, resp. standardu

s koncentracemi v rozsahu 0-2,5 mmol/l. Na základě kalibračního vztahu byla naměřená absorbance při vlnové délce 593 nm přepočítána na koncentraci  $\text{Fe}^{2+}$  ve vzorku s flavonoidy nebo antioxidantem. Do výpočtu byly použity údaje absorbance ve čtvrté minutě reakce.

Antioxidační aktivita byla vyhodnocena na základě získané kinetiky reakce a charakterizována veličinou:

$\Delta c/\Delta t$ , kde  $\Delta c$  je změna koncentrace  $\text{Fe}^{2+}$  ve vzorku na začátku reakce a v 240. sekundě a  $\Delta t$  je 240 sekund.

### ***Stanovení antioxidační aktivity extraktu z ostružin, malin, brusinek a borůvek pomocí metody ORAC.<sup>62</sup>***

Pro testování antioxidační aktivity extraktu z ostružin, malin a borůvek byla využita modifikovaná ORAC metoda. Standardní ORAC metoda využívá úbytku fluoresceinu. Modifikovaná ORAC metoda využívá přidavku pyrogallolové červeně, která se odbarvuje pouze po reakci s kyselinou askorbovou (přírodní polyfenoly s ní nereagují). Nejvyšší antioxidační aktivitu prokázal malinový extrakt. Vysoká antioxidační aktivita extraktu byla dána do souvislosti s vysokým obsahem kyseliny askorbové v malinách. Metoda umožnila určit jak příspěvek polyfenolů, tak příspěvek kyseliny askorbové do celkové antioxidační aktivity extraktu. Metodu lze použít také pro určení koncentrace kyseliny askorbové v komplexních vzorcích.

#### ***Postup antioxidační analýzy:***

Zásobní roztoky pyrogallolové červeně ( $1 \times 10^{-4}$ ) nebo fluoresceinu ( $1 \times 10^{-5}$ ) byly připraveny ve fosfátovém pufru 75 mM o pH 7,4.

Reakční směs obsahující 10 mM AAPH (2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid), 5  $\mu\text{mol}$  pyrogallolové červeně (s testovaným vzorkem nebo bez něj) byla inkubována ve 75 mM fosfátovém pufru s pH 7,4 při teplotě 37 °C. Antioxidační aktivita vzorků byla vyhodnocena spektrofotometricky podle vzrůstajícího úbytku absorbance pyrogallolové červeně při vlnové délce 540 nm.

Úbytek fluoresceinu byl odhadnut podle snižující se fluorescenční intensity (excitace při 493 nm, emise při 515 nm).<sup>62</sup>

***Určení fenolických látek a jejich antioxidační aktivity izolovaných z *Erigeron acris* L. (Asteraceae) pomocí průtokové metody s chemiluminiscenční detekcí.***<sup>63</sup>

Průtoková analytická metoda využívající chemiluminiscenční detekce byla použita pro antioxidační analýzu kyseliny kávové a 6'-caffeolrigrerosidu, nové přírodní látky, izolovaných z *Erigeron acris* L. Princip detekce je založen na inhibici chemiluminiscence vznikající reakcí luminolu a jodidu v alkalickém prostředí působením rostlinných polyfenolů.

***Postup:***

Zásobní roztok luminolu (0,025 mol/l) byl připraven v 0,06 mol/l NaOH. 0,05 mol/l roztok jodu byl připraven ve 100 ml vody obsahující 4 g jodidu draselného. Roztok luminolu a jodu byly kontinuálně přiváděny do nosného proudu (methanol:voda) FIA systému. Pro vyšší efektivnost chemiluminiscenční reakce byl systém vybaven dvěmi mísícími cívkami. Po přidání roztoku vzorku došlo k inhibici chemiluminiscence, hodnocené luminometrem.

***Stanovení antioxidační aktivity některých evropských druhů hub řádu Boletales (Hřibotvaré)***<sup>3</sup>

Pro testování antioxidační aktivity 47 druhů hub řádu Boletales byla použita metoda využívající DPPH radikál a peroxid vodíku s chemiluminiscenční detekcí. Při použití DPPH radikálu vykazoval největší antioxidační aktivitu druh *Gyrodon lividus*, při použití peroxidu vodíku *Strobilomyces floccopus*. V porovnání s jinými houbami, u kterých byla antioxidační aktivita již charakterizována, vykazovaly všechny druhy řádu Boletales relativně nízké hodnoty antioxidační aktivity. Antioxidační aktivita byla vztažena na celkový obsah fenolických látek v těchto houbách.

***Postup antioxidační analýzy:***

***Metoda DPPH se SIA detekcí:***

Zásobní roztoky všech druhů hub byly připraveny smícháním 4 mg extraktu v 4 ml 50% ethanolu a jejich sonikací po dobu 10 min. Stejným způsobem byly připraveny vzorky s koncentrací 1, 0,5, 0,25, 0,01 mg/ml. Roztok DPPH (0,1 mM) byl připraven smícháním 3,9 mg DPPH v 100 ml 50% ethanolu. Všechny roztoky byly podrobeny 10minutové sonikaci.

Pokles absorbance při 525 nm závisí na koncentraci antioxidantu v testovaném vzorku. Antioxidační aktivita byla vypočtena podle vzorce uvedeného na str. 32. Antioxidační aktivita byla vyjádřena pomocí  $EC_{50}$  (mg/ml).

*Metoda využívající peroxid vodíku s chemiluminescenční detekcí:*

Pro stanovení antioxidační aktivity pomocí hydroxylového radikálu byly použity extrakty hub vykazující  $EC_{50}$  menší než 1 mg/ml. Metoda byla popsána Cheng, Yan a Chang.<sup>64</sup> Reakční směs byla připravena smícháním 10 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $2 \times 10^{-4}$  M  $H_2O_2$  a 1 mM luminolu v 0,1M  $NaH_2PO_4$  pufru (pH 11,5). Jako nosič byla použita ultra čistá deionizovaná voda.

Intenzita luminescence byla měřena při 555 mV. Dynamické křivky byly zaznamenány 1 min po startu analýzy. Plocha pod křivkou byla zaznamenána v přítomnosti i v nepřítomnosti testovaných vzorků. Zásobní roztoky byly připraveny smícháním 4 mg extraktu s 4 ml 38% ethanolu a podrobeny sonikaci po dobu 10 min. Stejným způsobem byly připraveny vzorky s koncentrací 1, 0,5, 0,25, 0,01 mg/ml. Pokles chemiluminescence byl spočítán pomocí vzorce  $\% Q = (1 - AUC_x/AUC_0) \times 100$ , kde  $AUC_x$  je plocha pod křivkou v přítomnosti vzorku a  $AUC_0$  je plocha pod křivkou v nepřítomnosti vzorku.

## 6. Závěr

V posledních desetiletích stoupá počet civilizačních chorob, které vznikají následkem působení volných radikálů. Ve společnosti proto vzrůstá snaha chránit organismus před těmito radikály především exogenními preparáty jakou jsou čisté přírodní látky, rostlinné extrakty nebo potravinové doplňky.

Skutečnost, že antioxidanty přijímané potravou působí buď přímo v gastrointestinálním traktu, nebo mohou být resorbovány do organismu, je důležitá pro posouzení účinků antioxidační aktivity těchto látek. Je proto důležité souběžně s testováním antioxidační aktivity přírodních látek a jejich směsí *in vitro*, sledovat také antioxidační aktivitu po podání *in vivo*.

Analytické metody stanovení antioxidační aktivity lze rozdělit podle několika kritérií:

- a) podle typu radikálu, který je během analýzy použit (DPPH, ABTS, kyslíkový radikál aj.)
- b) podle typu detekce (spektrofotometricky, elektrochemicky, chemicky atp.)
- c) podle instrumentace, kterou využívají (standardní postup bez instrumentace, s instrumentací SIA, FIA, HPLC, atp.)

### SROVNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH METOD:

*ORAC, ABTS, DPPH*<sup>65</sup>:

Metoda ORAC je standardizovaná metoda měřící schopnost antioxidantů zhášet volné radikály, které se vyskytují v hydrofilních i hydrofobních biologických systémech a umožňující srovnávání výsledků mezi různými laboratořemi. Nevýhodou této metody je to, že vyžaduje drahé vybavení, jedna analýza trvá přibližně 1 h<sup>21</sup> a je citlivá na změny pH. Původní ORAC metoda využívající fluoresceinu je použitelná pouze pro hodnocení lipofilních antioxidantů.

Výhodou metody ABTS je její finanční nenáročnost, jednoduchost v provedení a účinnost při různých hodnotách pH. K nevýhodám patří to, že radikál není obsažen ve vzorku, je nutné ho vytvořit z ABTS. Takto vytvořený radikál má krátkou stabilitu.



Metoda DPPH není finančně náročná jako metoda ABTS a je jednoduchá v provedení. Roztok radikálu je stabilní po delší časový úsek. Výsledky metody DPPH jsou porovnatelné s výsledky metody ORAC. Nevýhodou metody DPPH je to, že reakce probíhají velmi pomalu, tudíž je složité zachytit kompletní antioxidační hodnoty. Metoda je dále citlivá na změny pH. K nevýhodám ABTS a DPPH metody lze počítat i to, že tyto radikály jsou syntetické a výsledky antioxidačních aktivit nelze vztahovat k *in vivo* podmínkám.

#### *Hodnocení lipidové peroxidace<sup>21</sup>*

Lipidová peroxidace probíhá v *in vivo* podmínkách a její *in vitro* hodnocení má z tohoto důvodu relevantní význam. K nevýhodám lze počítat nutnost izolace LDL částic a odběr krve od různých dárců. Dochází tak ke snížení reprodukovatelnosti měření.

#### *Metody využívající náročnější instrumentace<sup>32</sup>*

K těmto metodám můžeme počítat antioxidační testy využívající např. SIA, FIA nebo HPLC systém. K základním výhodám těchto metodik patří zrychlení analýz a zajištění vysoké reprodukovatelnosti díky naprogramování systému. Od takových analytických systémů se očekává také zvýšená citlivost měření. K nevýhodám se řadí počáteční vysoká finanční náročnost a nutnost využití proškolené a zkušené obsluhy.

#### *Metody hodnotící redukční aktivitu látek<sup>21</sup>*

K výhodám FRAP metody patří jednoduchost provedení, finanční a časová nenáročnost. Metoda může být použita jak v manuálním, tak automatickém provedení (např. HPLC). K nevýhodám se řadí způsob vyhodnocení redukční aktivity v závislosti na časovém intervalu. Různé antioxidanty vážou železo různou silou v různém časovém intervalu. Některé fenoly vyžadují vyhodnocení analýzy v krátkém čase (4 min), zatímco jiné je nutno hodnotit až po delší době (30 min). Tímto rozporem dochází k snížení porovnatelnosti jednotlivých antioxidačních aktivit různých látek. Další nevýhodou je to, že lze hodnotit pouze látky které redukují železo. Metoda není použitelná např. pro hodnocení thiolů (např. glutathion).

Měď jako samostatný prvek, ale i jako součást sloučenin, má nižší redoxní potenciál než železo, a proto je metoda CUPRAC oproti metodě FRAP více selektivní a nedochází tak např. k oxidaci cukrů nebo kyseliny citronové během měření. Nižší redoxní potenciál mědi

umožňuje také lepší hodnocení potenciálních prooxidantů. K výhodám CUPRAC metody patří i její široká použitelnost pro různé antioxidanty včetně thiolů.

Cyklická voltametrie je vhodná pro detekci lipofilních i hydrofilních látek antioxidantů s nízkou molekulovou hmotností. Výhodou této metody je detekce izolovaných látek v rozpětí 1-10 $\mu$ M. Získávání vzorku je jednoduché a použití této metody je velmi nenáročné.<sup>31</sup>

Vzhledem k zajištění objektivnosti získaných výsledků se v poslední době autoři snaží aplikovat několik metod současně pro sledování antioxidační aktivity v biologických materiálech a také se snaží o srovnání použitých metodik.<sup>66</sup>

Je důležité, aby použitá analytická metoda byla nejen efektivní a jednoznačná, ale také finančně a časově nenáročná, umožňující testování velkého množství vzorků v krátkém čase.

## 7. Seznam použité literatury

1. Štípek, S. a kolektiv, Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, GRADA Publishing 2000, ISBN 80-7169-704-4, s. 21-23, 25-30, 32-37, 41-42, 44, 54-55, 65-66, 292-293.
2. Jaroslav Racek, Václav Holeček, 1999, Enzymy a volné radikály, Chemické Listy 93, 774-780.
3. Kateřina Macáková et al., 2009, Free-radical scavenging activity of some european Boletales, Natural Product Communications Vol 4, No. 2, 261-264.
4. Pavel Kalač, 2003, Funkční potraviny - kroky ke zdraví, ISBN 80-7322-029-6.
5. L.D. Mello, L.T. Kubota, 2007, Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation, Talanta 72, 335-348.
6. Hana Paulová, Hana Bochořáková a Eva Táborská, 2004 Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*, Chemické Listy 98, 174-179.
7. Kolečkář V. et al., 2007, Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození. Česká a slovenská farmacie 56, 73-76.
8. Cook N.C., Samman S., 1996, Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Journal of Nutricional Biochemistry 7, 66-76.
9. Murray, Robert K., et al., 2002, Harperova biochemie. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 2,3,4. vyd. v ČR. Praha, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
10. Ernster L., Dallner G., 1995 Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. Biochimica et Biophysica Acta 1271, 195-204.
11. Stenesh, J. 1989, Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (2nd Edition). John Wiley & Sons.
12. Balasundram N., Sundram K., Samman S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry 99, 191-203.
13. Kolečkář V. et al., 2008, Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. Mini Review in Medicinal Chemistry 8, 436-447.
14. Manach C., Mazur A., Scalbert A., 2005, Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. Current Opinion in Lipidology 16, 77-84.
15. [www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf](http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf), čerpáno dne 21.2.2009.

16. Jan Heinrich, Irena Švarcová, Kateřina Valentová, 2008, Plody *Lonifera caerulea*: perspektivní funkční potravina a zdroj biologicky aktivních látek, *Chemické Listy* 102, 245-254.
17. Okezie I. Aroma, 2003, Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mutation Research* 523–524, 9–20.
18. Magalhaes L.M. et al., 2009, Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity, *Talanta* 77, 1559-1566.
19. Damir Iveković et al., 2005, Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation, *Analyst* 130, 708-714.
20. K.M. Lo, Peter C.K. Cheung, 2005, Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *Alba*, *Food Chemistry* 89, 533–539.
21. Ronald L. Prior, Xianli Wu, Karen Schaich, 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements, *Journal of agricultural and food chemistry* 53(10), 4290-302.
22. L.M. Cheung, Peter C.K. Cheung, Vincent E.C. Ooi, 2003, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, *Food Chemistry* 81, 249–255.
23. Cao G., Sofic E., Prior R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine* 22, 749-760.
24. Guohua Cao, Emin Sofic, Ronald L. Prior, 1996, Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables, *Journal of agricultural and food chemistry* 44, 3426-3431.
25. Boxin Ou, Maureen Hampsch-Woodill, Ronald L. Prior, 2001, Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe, *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 4619-4626.
26. Marcel Karabín, Pavel Dostálek, Pavel Hofta, 2006, Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství, *Chemické Listy* 100, 184-189.
27. Slavomír Marcinčák et al., 2006, Stanovení malondialdehydu v bravčovom mäse s použitím extrakcie na tuhej fáze a HPLC, *Chemické Listy* 100, 528-532.
28. Benzie I.F.F., 1996, An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). *Clinical Biochemistry* vol. 29, No. 2, 111-116.
29. Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
30. Raquel Pulido, Laura Bravo, Fulgencio Saura-Calixto, 2000, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 3396-3402.

31. Ron Kohen et al., 2000, Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 28, No. 6, 871–879.
32. Harm A.G. Niederlander et al., 2008, Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1210, 121–134.
33. I.I. Koleva, H.A.G. Niederlander, T.A. van Beek, 2000, *Analytical Chemistry* 72, 2323.
34. Polášek M. et al., 2004, Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379, 754-758.
35. Manuál k přístroji FIALab 3000 analyser (FIALab Instruments Inc., Bellevue, WA, USA), přeloženo z anglického jazyka.
36. Hana Paseková, Miroslav Polášek a Petr Solich, 1999, Sekvenční injekční analýza, *Chemické Listy* 93, 354-359.
37. Luís M. Magalhaes et al., 2009, Automatic flow injection based methodologies for determination of scavenging capacity against biologically relevant reactive species of oxygen and nitrogen, *Talanta* 02.006.
38. N. Pellegrini et al., 2002, Application of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Radical Cation Assay to a Flow Injection System for the Evaluation of Antioxidant Activity of Some Pure Compounds and Beverages, *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 260-264.
39. S. Bompadre et al., 2004, Improved FIA-ABTS Method for Antioxidant Capacity Determination in Different Biological Symplex, *Free Radical Research* 38, 831-838.
40. M.J.R. Lima, I.V. Toth, A.O.S.S. Rangel, 2005, A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity, *Talanta* 68, 207-213.
41. S. Milardovic et al., 2007, A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity using enzymatically produced ABTS + and biamprometric detector containing interdigitated electrode, *Talanta* 71, 213-220.
42. M.A. Segundo, A.O.S.S. Rangel, 2002, Automatic flow systems based on sequential injection analysis for routine determinations in wines, *Analytica Chimica Acta* 458, 131.
43. H.R. Silva et al., 2003, Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity, *Chemical Society* 14, 59.
44. V. Kolečkář et al., 2008, Evaluation of natural antioxidants of *Leuzea carthamoides* as a result of a screening study of 88 plant extracts from the European Asteraceae and Cichoriaceae, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 23, 218-224

45. J.W. Costin et al., 2003, Monitoring the Total Phenolic/Antioxidant Levels In Wine using Flow Injection Analysis with Acidic Potassium Permanganate Chemiluminescence Detection, *Analytica Chimica Acta* 499, 47.
46. K.S. Minioti, C.A. Georgiou, 2008, High throughput flow injection bioluminometric method for olive oil antioxidant capacity, *Food Chemistry* 109, 455-461.
47. L.K. Shpigunet al., 2006, Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts, *Analytica Chimica Acta* 573, 419-426.
48. S. Mannino et al., 1998, A New Method for the Evaluation of the Antioxidant Power of Wines, *Electroanalysis* 10, 908-912.
49. S. Mannino et al., 1999, Evaluation of the antioxidant power of olive oils based on a FIA system with amperometric detection, *Analyst* 124, 1115.
50. A.J. Blasco et al., 2006, Electroanalytical Approach to Evaluate Antioxidant Capacity in Honeys: Proposal of an Antioxidant Index *Electroanalysis* 18, 1821.
51. S. Buratti et al., 2008, A low-cost and low-tech electrochemical flow system for the evaluation of total phenolic content and antioxidant power of tea infusions, *Talanta* 75, 312-316.
52. P. Perusse, D. Leech, 2003, A Voltammetric Assay of Anti-oxidants and Inhibitors of Soybean Lipxygenase, *Electroanalysis* 15, 573-578.
53. Re R. et al., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 1231-1237.
54. Chu Y. H., Chang C. L., Hus H. F., 2000, Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 561-566.
55. Ng T. B., Liu F., Wang Z. T., 2000, Antioxidative activity of natural products from plants, *Life Science* 66, 709-723.
56. Zhang A. et al., 1997, Inhibitory effect of jasmine green tea epicatechin isomers on LDL-oxidation, *Nutritional Biochemistry* 8, 334-340.
57. Lowry O.H. et al., 1951, Protein measurement with the folin-phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
58. Bandoniene D, Murkovic M., 2002, The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH Metod, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 53, 45-49.
59. Miloslav Šulc et al., 2007, Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor, *Chemické Listy* 101, 584-591.

60. Parejo L., Codina C., Petrakis C., Kefalas P., 2000, Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH free radical assay, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44(3), 507-512.
61. Silvia Jiráková et al., 2006, Kvantitatívne vzťahy medzi štruktúrou a schopnosťou flavonoidov redukovať železitý komplex, *Chemické Listy* 100, 980-986.
62. E. Atala et al., 2009, Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology, *Food Chemistry* 113, 331-335.
63. Edyta Nalewajko-Sieliwoniuk et al., 2008, Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in *Erigeron acris* L. extracts and pharmaceutical formulation by flow injection analysis with inhibited chemiluminescent detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48, 579-586.
64. Cheng Z, Yan G, Li Y, Chang W., 2003, Determination of antioxidant activity of phenolic antioxidants in a Fenton-type reaction system by chemiluminescence assay. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 375, 376-380.
65. Joseph M. Atika et al., 2003, Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products, *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 6657-6662, 6657.
66. Fogliano V. et al., 1999, Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines, *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 1035.

## 8. Abstract

**Baronová, P.** Analytické metody stanovení antioxidační/antiradikálové aktivity.  
**Diplomová práce 2009, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta  
v Hradci Králové, 64 s.**

Antioxidačně aktivní látky nachází uplatnění v prevenci i léčbě různých nemocí. Z tohoto důvodu je antioxidační aktivita přírodních i syntetických látek celosvětově široce zkoumána. Pro její hodnocení byla vypracována řada různých metod.

První část práce je zaměřena na volné radikály, jejich zdroje a působení v organismu, popis endogenních a exogenních antioxidantů, které jsou rozděleny podle struktury na vysokomolekulární a nízkomolekulární a podle původu na syntetické a přírodní.

V práci jsou popsány základní metody stanovení antioxidační aktivity látek, zahrnující testy hodnotící eliminaci volných radikálů (syntetických i endogenních), lipidovou peroxidaci nebo redoxní vlastnosti látek (metody chemické, elektrochemické). Pozornost je věnována také využití instrumentálních metod v antioxidační analýze, např. HPLC nebo průtokovým injekčním systémům.

V práci jsou uvedeny případy využití popsaných metod v praxi. V závěru jsou jednotlivé metody srovnány z hlediska jejich výhod a nevýhod.



## 9. Abstract

**Baronová, P.** Analytical methods of evaluation of antioxidant/free-radical scavenging activity. **Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 65 pp.**

Antioxidant active compounds play a positive role in the prevention and threatment of many diseases. Consequently, antioxidant activity of natural and synthetic compounds is world-widely investigated. For this purpose, many methods for the evaluation of the activity were elaborated.

The first part of this review is focused on the describtion of free radicals, its origin and function in the human body. Antioxidants are divided into several subclasses like endogenous and exogenous, which are divided to high-molecular or low molecular according to the structure, and synthetic and natural according to the origin. The methods for determination of free radicals (synthetic or endogenous radicals) scavenging activity, evaluation of inhibition of lipid peroxidation, or redox properties (chemical or elektrochemical methods) of tested compounds are enclosed in this thesis. The instrumetnal analytical methods like HPLC or SIA (sequential injection methods) and FIA are also mentioned.

The review also describes the practical examples of use of various described methods. In the conclusion, the advantages and disadvantages of individual methods are evaluated.